

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD (LYON I)

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1977 - N° 164

LA STÉRILISATION PAR LES RAYONNEMENTS IONISANTS

*Détermination de la sensibilité aux rayons γ
de 130 souches microbiennes d'origine hospitalière*

THÈSE

présentée

à l'Université Claude Bernard - Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

et soutenue publiquement le 4 novembre 1977

pour obtenir le grade de DOCTEUR d'ÉTAT EN PHARMACIE

par

TRANSY Marie-José

née le 11 juin 1945

à LYON (4e)

Année 1977

LA STÉRILISATION PAR LES RAYONNEMENTS IONISANTS

*Détermination de la sensibilité aux rayons γ
de 130 souches microbiennes d'origine hospitalière*

THESE

présentée

à l'Université Claude Bernard - Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

et soutenue publiquement le 4 novembre 1977

pour obtenir le grade de DOCTEUR d'ÉTAT EN PHARMACIE

par

TRANSY Marie-José

née le 11 juin 1945
à LYON (4e)

ANNEE 1917

LA STÉRILISATION PAR LES RAYONNEMENTS IONISANTS

Détermination de la sensibilité aux rayons
de 130 souches microbiennes d'origine hospitalière



TITRE

AUTEUR

21/10/1917
BIBLIOTHEQUE DE LA FACULTE DE MEDECINE
DE L'UNIVERSITE DE LEIDEN

Reçu par le service de la bibliothèque le 4 novembre 1917

pour servir la bibliothèque de la Faculté de Médecine

1917

TRANSF. 1917-1918

1917-1918

21/10/1917

UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD

PRESIDENT : M. le Professeur D. GERMAIN

PREMIER VICE-PRESIDENT : M. le Professeur ELBAZ

DEUXIEME VICE-PRESIDENT : M. P. PONCET, Maître-Assistant

TROISIEME VICE-PRESIDENT : M. C. BADOR, Etudiant

SECRETAIRE GENERAL DE L'UNIVERSITE : M. J. RAMBAUD, Administrateur Civil

DIRECTEURS DES UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

U.E.R. de MEDECINE GRANGE-BLANCHE : Monsieur Bernard SALLE, M.C.A.

U.E.R. de MEDECINE ALEXIS-CARREL : Monsieur le Pr René MORNEX

U.E.R. de MEDECINE LYON-NORD : Monsieur Jean-Pierre NEIDHART, M.C.A.

U.E.R. de MEDECINE SUD-OUEST : Monsieur le Pr Jean NORMAND

U.E.R. des SCIENCES PHARMACEUTIQUES : Monsieur le Pr Charles-Albert BIZOLLON

U.E.R. de TECHNIQUES DE READAPTATION : Monsieur Alain MORGON, M.C.A.

U.E.R. de BIOLOGIE HUMAINE : Monsieur Jean-Pierre REVILLARD, M.C.A.

U.E.R. I.R.E.P.S. : Monsieur Albert MILLON, Professeur d'E.P.S.

U.E.R. de Sciences Odontologiques : Monsieur le Dr Roger VINCENT

U.E.R. de MATHEMATIQUES : Monsieur le Pr Edmond COMBET

U.E.R. de PHYSIQUE : Monsieur le Pr Jean DELMAU

U.E.R. de CHIMIE-BIOCHIMIE : Monsieur le Pr Jean HUET

U.E.R. de SCIENCES DE LA NATURE : Monsieur le Pr René GINET

U.E.R. de SCIENCES PHYSIOLOGIQUES : Mademoiselle le Pr Jeanne-Françoise WORBE

U.E.R. de PHYSIQUE-NUCLEAIRE : Monsieur le Pr Mark GUSAKOW

I.U.T. n° 1 : Monsieur le Pr Bernard POUYET

I.U.T. n° 2 : Monsieur J. GALLET, Directeur E.N.S.A.M.

OBSERVATOIRE DE LYON : Monsieur Guy MONNET, Astronome Adjoint

U.E.R. de MECANIQUE : Mademoiselle le Pr Geneviève COMTE-BELLOT.

Examineurs de la Thèse :

Président	Monsieur le Professeur CARRAZ
	Monsieur le Professeur FLEURETTE
	Monsieur le Professeur QUINCY
	Monsieur le Professeur TERRAILLON, MCA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554225_0005

Je dédie ce travail,

A mes parents,

qui par leurs efforts exemplaires m'ont permis de
devenir ce que je suis.

Je suis heureuse de leur dire ici toute ma reconnaiss-
sance et ma profonde affection.

A ma Grand-mère,

A Michel, Hélène et Delphine,

A François, Brigitte et Estelle,

A Catherine

en témoignage de ma profonde affection

A toute ma famille

A mes amis.

A notre Président de thèse Monsieur le Pr. CARRAZ

qui nous a fait l'honneur de présider cette thèse.

Nous admirons en lui l'énergie, l'enthousiasme et l'efficacité qu'il sait communiquer à son entourage.

Nous avons, depuis peu de temps, l'honneur de faire partie de son équipe ; qu'il veuille bien croire à l'expression de notre dévouement et à notre respectueuse considération.

A Monsieur le Professeur FLEURETTE

qui a bien voulu nous confier ce travail qu'il a guidé quotidiennement avec rigueur et beaucoup de patience.

Nous avons travaillé avec lui pendant plusieurs années au cours desquelles nous avons pu admirer sa lucidité, sa grande rigueur scientifique, son opiniâtreté dans le travail.

Il nous a guidé avec une bienveillante sollicitude et une patience constante dans l'apprentissage de notre métier et nous a aidé et conseillé dans le déroulement de notre carrière ; nous lui en sommes profondément reconnaissant.

Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre dévouement et de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur QUINCY

qui nous a fait bénéficier de son savoir dans des disciplines aussi différentes que la chimie analytique et l'immunologie et avec qui nous avons eu de fréquents contacts dans notre exercice professionnel.

Nous le remercions d'avoir bien voulu juger ce travail et nous aimerions qu'il trouve ici l'expression de notre profonde considération.

A Monsieur le Professeur TERRAILLON

a qui nous serons toujours reconnaissant de nous
avoir donné le goût de la Microbiologie ; en effet
son enseignement toujours clair et vivant a marqué
notre vie d'étudiant.

Il a bien voulu accepter de participer à notre jury.

Qu'il veuille bien trouver ici nos respectueux remer-
ciements.

A Monsieur EMERY et Monsieur CORNUET du C.E.N.G.

qui par leur aide technique ont permis la réalisation de ce travail.

Nous les remercions bien vivement.

A tous mes collègues Assistants, attachés et internes,

Aux stagiaires de 5e année de pharmacie et

A Mesdames M. DURAND et V. DELORME

que nous remercions de leur précieuse collaboration
technique

A Madame N. NOEL

qui a assuré avec soin et minutie la dactylographie
de cette thèse ; nous la remercions bien sincèrement.

A tout le personnel du Laboratoire de Bactériologie de
l'Hôpital Cardiovasculaire et Pneumologique de Lyon et
de l'U.E.R. Alexis Carrel.

I N T R O D U C T I O N

L'activité bactéricide des rayonnements ionisants est connue depuis longtemps, pratiquement depuis la découverte des rayons X. Cependant, ce n'est que depuis ces 25 dernières années que la radiostérilisation est un procédé utilisable ; en effet, il a fallu attendre que la technologie nucléaire se développe pour permettre de réaliser des accélérateurs d'électrons suffisamment puissants ou de produire en grande quantité des isotopes radioactifs.

L'essor de la stérilisation par les rayonnements ionisants est dû en grande partie à l'arrivée sur le marché du matériel médico-chirurgical à usage unique qui, le plus souvent constitué de matériau thermosensible, nécessitait de nouveaux procédés de stérilisation. Mais les domaines d'application de la radiostérilisation sont vastes, c'est pourquoi ce sujet a suscité de nombreux travaux pour préciser le mode d'action au niveau cellulaire, la sensibilité des principaux microorganismes, les facteurs intervenant sur la radiosensibilité et les applications envisageables.

Nous-mêmes travaillons sur ce sujet depuis plusieurs années, en particulier sur la stérilisation de tissus biologiques tels que valves aortiques et implants dentaires, de substances pharmaceutiques comme les antibiotiques. Nous avons abordé également une étude plus théorique sur la sensibilité aux rayonnements gamma de souches microbiennes isolées en milieu hospitalier car les travaux réalisés auparavant avaient surtout porté sur des souches de collection ou des souches isolées dans le milieu industriel.

C'est ce travail qui est présenté dans cette thèse car la plupart des études citées précédemment ont été publiées (82 - 127 - 127 bis - 128 - 230 - 333). Mais avant d'aborder ce travail personnel, nous avons pensé qu'il était utile de réaliser une étude bibliographique relativement exhaustive sur ce nouveau procédé de stérilisation qui n'est pas toujours très bien connu.

I - GENERALITE SUR LES RADIATIONS IONISANTES

I - GENERALITES SUR LES RADIATIONS IONISANTES

Avant d'aborder l'étude de l'action des radiations ionisantes sur les microorganismes, il est nécessaire d'avoir quelques notions sur :

- les caractéristiques physiques des radiations ionisantes,
- les sources de radiation,
- les unités de mesure des doses de rayonnement et les méthodes de dosimétrie.

Nous ne ferons qu'un exposé succinct de ces différentes questions, car nos connaissances en physique atomique sont malheureusement assez sommaires.

I.1. - Définition des radiations ionisantes

Les radiations réagissent avec la matière en transférant leur énergie aux atomes du matériel irradié.

Les radiations ionisantes sont celles qui possèdent suffisamment d'énergie pour que, au moment de la collision, un électron soit éjecté de l'atome.

Il existe deux types de radiations ionisantes :

- les radiations électromagnétiques,
- les radiations corpusculaires.

I.2. - Propriétés physiques et mécanismes d'interaction avec la matière des différentes radiations. (30a - 38 - 53 - 299)

I.2.1. - Radiations électromagnétiques

Les radiations électromagnétiques sont des flux de particules énergétiques encore appelées photons.

Il existe deux types de radiations électromagnétiques ionisantes, les rayons X et les rayons γ .

Les rayons ultra-violet ne font pas partie des radiations ionisantes, car les photons ne sont pas suffisamment énergétiques pour créer des ionisations.

Les rayons X et les rayons γ ont des propriétés semblables mais différent par leurs mécanismes d'émission.

Les rayons γ sont émis par les noyaux atomiques d'isotopes radioactifs, par transition d'un état excité à un état de plus faible énergie.

Les rayons X sont produits par transition électronique, lors du bombardement d'atomes métalliques avec un flux d'électrons accélérés. Mais nous verrons plus en détail, par la suite quelles sont les différentes sources de radiations ionisantes.

Les deux types de rayonnement ont des propriétés physiques identiques. En effet, les photons des rayons X et γ n'ont ni masse, ni charge et possèdent un pouvoir de pénétration considérable.

L'intensité de pénétration est régie par l'équation suivante :

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\mu_1 x}$$

I_0 = intensité du rayonnement incident

I = intensité du rayonnement après absorption

μ_1 = est le coefficient d'absorption qui dépend de la composition du matériel traversé

x = est l'épaisseur traversée.

Comme pour toutes les radiations électromagnétiques, la relation entre la quantité d'énergie du photon et sa longueur d'onde λ est donnée par la formule :

$$E = h \nu = \frac{hc}{\lambda}$$

h est la constante de Plank

ν est la fréquence

c : la vitesse de la lumière.

Il apparaît donc que plus la longueur d'onde est faible, plus l'énergie est importante.

Les rayons X sont produits avec un domaine de longueur d'onde étendu (qui dépend de l'énergie de l'électron incident).

Les rayons X dits "mous" ont une λ supérieure à $0,1 \text{ \AA}$ ($0,1 \text{ Mev}$) *

Les rayons X "durs" ont des longueurs d'ondes plus faibles et ont donc un pouvoir de pénétration plus important.

Les rayons γ ont des longueurs d'ondes encore plus faibles :

par exemple, le Cobalt 60 émet des radiations de $0,0106 \text{ \AA}$ ($1,17 \text{ Mev}$) et $0,00932 \text{ \AA}$ ($1,33 \text{ Mev}$).

Les radiations ionisantes électromagnétiques n'étant pas chargées ne peuvent créer des ionisations directement. Elles réagissent avec les atomes du matériel irradié, par des collisions au cours desquelles l'énergie est transférée du photon à l'atome. Cette énergie est transférée selon 3 mécanismes (voir figure 1) :

- Effet photoélectrique : C'est le transfert de l'énergie totale du photon à l'atome qui aboutit à l'éjection d'un électron. Ceci se produit quand l'énergie du photon est légèrement plus grande que celle de l'orbitale de l'électron.

L'électron éjecté peut ensuite créer d'autres ionisations ou excitations. L'effet photoélectrique prédomine avec des radiations ayant une énergie d'environ 10^4 ev et pour du matériel dont les atomes ont un numéro atomique élevé.

Pour du matériel organique et avec des radiations ayant une énergie supérieure à 10^4 ev l'absorption d'énergie par effet photoélectrique est faible.

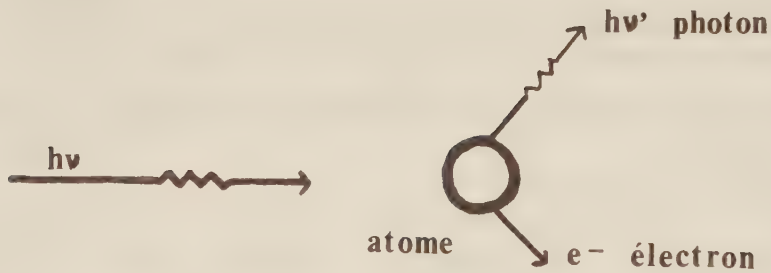
- L'effet Compton prédomine avec des radiations de $2,5 \cdot 10^5$ à $4 \cdot 10^6 \text{ ev}$. Il se produit quand il y a interaction entre le photon et un électron d'une orbitale externe ayant une énergie beaucoup plus faible que celle du photon, si bien que celui-ci perd une partie seulement de son énergie (avec diminution de la fréquence). Il pourra donc encore créer d'autres collisions jusqu'à ce que son énergie soit suffisamment faible pour être absorbée par effet photoélectrique.

* L'électron volt est l'unité d'énergie d'une radiation, il représente l'énergie acquise par un électron en mouvement sous une différence de potentiel de 1 volt, il est équivalent à $1,602 \times 10^{-12} \text{ erg}$.

* Effet photoélectrique



* Effet Compton



* Production de paires d'électrons

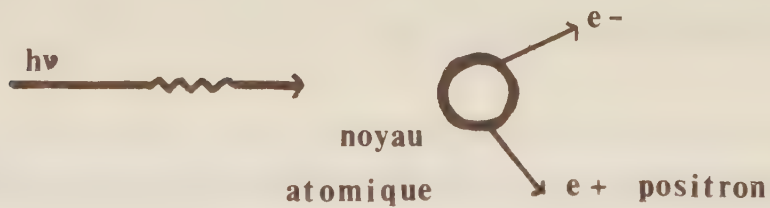


Figure 1 : DIFFERENTS MECANISMES D'INTERACTION DES
RAYONNEMENTS IONISANTS AVEC LA MATIERE

- Production de couple électron-positron (production de paires)
+++++

Pour les radiations ayant une énergie supérieure à $1,02 \cdot 10^6$ ev, les photons très énergétiques peuvent réagir directement avec le noyau atomique, pour aboutir à la formation de deux particules : un électron et un positron (antiparticule de l'électron ayant une charge positive). S'il n'y a pas d'énergie en excès, les deux particules nouvelles se recombinent immédiatement avec émission de deux photons. Quand il y a un excès d'énergie, ces particules peuvent créer d'autres ionisations jusqu'à ce que l'excès d'énergie soit nul.

Ce mécanisme de "production de paires" se produit surtout dans un matériel ayant un nombre atomique élevé. Dans la matière vivante et avec des énergies de radiations inférieures à $2 \cdot 10^6$ ev, cette réaction ne se produit pas.

I.2.2. - Radiations corpusculaires

Les flux de particules habituellement utilisés en radiobiologie sont les flux - de particules α

- de protons
- de neutrons
- et surtout d'électrons

I.2.2.1. - Rayons α

Les particules α sont les noyaux des atomes d'hélium. Ce sont des particules ayant une double charge positive et un poids atomique de 4. Ces particules sont émises par un petit nombre de substances radioactives. Elles ont une charge élevée, donc un fort pouvoir ionisant, mais en raison de leur gros volume et de leur faible vitesse, le pouvoir de pénétration est faible (7 micromètres dans l'eau pour le rayonnement du radium c').

I.2.2.2. - Protons

Ce sont les noyaux de l'hydrogène, ils ont une masse de 1 et une seule charge. Des protons de grande énergie peuvent être produits

artificiellement par des cyclotrons, protons synchrotrons ou des générateurs de Van de Graft. Ils sont intermédiaires par leur pouvoir pénétrant et leur pouvoir ionisant entre particules α et électrons.

I.2.2.3. - Neutrons

Particules ayant une masse de 1 et non chargées. Les neutrons rapides ne produisent pas directement des ionisations, mais agissent en libérant les protons des noyaux atomiques du matériel irradié. Le nombre d'ionisations produites dépend beaucoup de la composition du matériel soumis à irradiation.

Les neutrons lents n'éjectent pas de protons et sont capturés par les noyaux au travers desquels ils passent et produisent des nouveaux noyaux qui peuvent être radioactifs.

I.2.2.4. - Flux d'électrons encore appelés rayons β^-

Ce sont des particules ayant une seule charge négative et une faible masse. Ils sont obtenus avec des générateurs spéciaux ou émis par des isotopes radioactifs. Le pouvoir pénétrant des rayons β^- dépend de leur énergie. Les rayons β provenant d'une source isotopique ont un faible pouvoir pénétrant. Par contre, les électrons produits dans des générateurs (rayons cathodiques) peuvent être accélérés et atteindre de très hautes énergies (de l'ordre du Mev).

Le pouvoir pénétrant des "électrons accélérés" peut être calculé par l'équation suivante =

$$R \text{ max} = \frac{0,542 E - 0,133}{\rho}$$

où R est la pénétration maximum

ρ est la densité du matériel

E est le voltage avec lequel les électrons ont été accélérés.

Les flux d'électrons accélérés sont les seuls rayonnements corpusculaires qui ont un pouvoir pénétrant suffisant pour être utilisés pour la stérilisation de matériel.

Bien que toutes ces particules diffèrent par leur taille et leur charge, leur mécanisme d'interaction avec la matière est le même (excepté pour les neutrons).

Lorsque les particules passent suffisamment près d'un atome, ou quand il y a collision, si l'énergie est suffisante un électron pourra être éjecté avec création d'un ion positif et d'un électron libre. Dans l'air il faut environ 34 ev pour produire un tel effet. Les électrons éjectés qui sont suffisamment énergétiques pourront à leur tour créer d'autres ionisations. Quant à la particule chargée, elle poursuit sa trajectoire jusqu'à ce qu'elle ait perdue l'énergie suffisante pour créer d'autres ionisations.

Quand l'interaction entre atome et particule n'aboutit pas à une libération d'énergie suffisante pour que l'électron soit libéré, il y a création d'une excitation, c'est à dire que l'électron est déplacé sur une orbitale de plus haute énergie.

I.3. - Mécanismes généraux de production de l'ionisation (30a - 38 - 53 - 299)

Ionisation spécifique et transfert linéaire d'énergie

Finalement, que le rayonnement soit électromagnétique ou corpusculaire, les ionisations sont dues à l'éjection d'électrons orbitaux et au passage dans la matière d'électrons énergétiques éjectés ou directement émis (c'est à dire secondaires ou primaires).

Quand l'électron n'a plus suffisamment d'énergie pour créer des ionisations ou des excitations, il est capturé par un atome ayant une affinité pour les électrons, ce qui aboutit à la formation d'un ion négatif.

Il y a donc formation d'un ion négatif pour chaque ion positif créé lors de l'éjection de l'électron. C'est pourquoi l'on parle toujours de formation d'une paire d'ions.

Avec les rayons β il peut y avoir un excès de charge électrique dû aux électrons accélérés qui ont été stoppés dans le matériel irradié. Cependant cet excès de charge est toujours faible en comparaison avec le nombre de paires d'ion formées.

Donc, en fait, le mécanisme d'apparition des ionisations étant proche, les différents types de radiations ionisantes diffèrent :

- par leur pouvoir de pénétration,

- par la distribution spatiale des ionisations. Celle-ci est en effet différente selon que la source d'ionisation est corpusculaire ou électromagnétique. Dans le deuxième cas, les photons pénètrent sur une grande distance. L'interaction se fait au hasard, mais l'absorption a lieu selon une exponentielle (38). Si une épaisseur donnée de matériel diminue l'intensité du photon de moitié, une autre épaisseur égale du même matériel réduira encore l'intensité de moitié (l'intensité finale aura donc le quart de l'intensité initiale).

Dans le premier cas, les radiations ont un certain pouvoir pénétrant, et au delà d'une certaine épaisseur, il n'y a plus aucune ionisation ou excitation. Dans le cas particulier des flux d'électrons, le taux maximum de pénétration est fonction de l'énergie de l'électron et du nombre atomique du matériel absorbant.

Les différents types de radiations ont un transfert d'énergie ou LET ^{*} différent. En effet, le LET est proportionnel au carré de la charge de la particule et inversement proportionnel à la vitesse. Donc les particules qui ont une charge élevée ou une vitesse faible (particules α , neutrons, protons) ont un LET élevé. Par contre les rayons X et γ les électrons accélérés ont un LET relativement faible.

I.4. - Sources de rayonnement

Les radiations ionisantes, ayant un pouvoir de pénétration suffisant pour permettre leur utilisation comme agent de stérilisation sont les rayons X et surtout les rayons γ et les flux d'électrons accélérés. Nous n'envisagerons donc que les sources de ces différentes radiations.

* Le transfert linéaire d'énergie est la quantité d'énergie en Kilo ev perdue sur une longueur d'un micron par la particule ionisante initiale. Il rend compte de toutes les interactions aussi bien ionisations qu'excitations.

I.4.1. - Rayons X (299 - 314)

Ils sont produits par bombardement de cible de métaux lourds par des électrons accélérés. C'est donc un rayonnement artificiel produit par des appareils. La longueur d'onde des rayons X produits, dépend de l'énergie du flux d'électrons utilisé, de l'angle sous lequel les électrons frappent la cible et de la nature de celle-ci.

Le spectre d'une émission de rayons X comprend des longueurs d'onde qui varient de $10 \text{ \AA}$ à $10^{-4} \text{ \AA}$. Les rayons X mous ont une longueur d'onde $> 0,1 \text{ \AA}$; ils sont produits à des voltages inférieurs à 100 Kilovolts. Les rayons X durs, donc plus pénétrants, ont des longueurs d'onde plus faibles. Avec des tubes de 400 Kilovolts (30 a), on obtient des rayons X de longueur d'onde moyenne d'environ $0,06 \text{ \AA}$.

Les rayons X produits par des générateurs de plusieurs millions de volts ont des longueurs d'onde voisines de celles des rayons γ .

I.4.2. - Rayons γ (23 - 43 - 299)

Ils sont émis par différents isotopes radioactifs. Actuellement, deux isotopes sont utilisés pour la fabrication d'irradiateurs industriels :

- le Cobalt 60 qui émet des rayons γ de 1,17 et 1,33 Mev et qui a une demi-vie de 5,2 ans (une source de Cobalt 60 perd donc la moitié de sa puissance en 5 ans).
- le Caesium 137 qui émet un rayonnement γ de 0,661 Mev et qui a une demi-vie plus longue, puisqu'elle est de 33 ans.

Malgré une demi-vie courte le Cobalt 60 a été le plus employé pour plusieurs raisons :

- il est disponible en plus grande quantité (facilement obtenu en réacteur par irradiation du Co 59) ;

- il est produit sous forme de lingot ou de billes métalliques qui sont faciles à manipuler et à encapsuler, alors que le Caesium est produit à l'état de chlorure plus difficile à manipuler.

On dispose donc de sources de Cobalt 60 plus économiques et plus puissantes.

Les irradiateurs à radioéléments possèdent certains avantages : le rayonnement émis est très pénétrant, l'irradiation est uniforme, la dosimétrie est assez facile.

En général, un centre d'irradiation industriel émetteur γ est composé de :

- la source radioactive, qui peut être de géométrie variable, et qui est le plus souvent constituée de gaine en acier inoxydable renfermant l'isotope. Elle est placée dans une chambre d'irradiation.
- une enceinte possédant d'épais murs de béton qui assurent une protection du personnel pendant le fonctionnement.
- lorsque l'on veut pénétrer dans cette enceinte, la source peut être placée dans une enceinte de stockage, la protection étant assurée par une grande épaisseur d'eau (piscine), de terre, de béton ou de plomb.
- un convoyeur fait défiler le matériel à stériliser devant la source de façon à ce que toutes les faces des objets soient exposées.
- des annexes : tableau de commande, pièce de chargement du convoyeur, laboratoire de dosimétrie.

I.4.3. - Les rayons β^-

Il existe des isotopes radioactifs émetteurs de rayons β , mais ceux-ci ont un pouvoir pénétrant faible. C'est pourquoi, seuls sont utilisés pour la radiostérilisation, des accélérateurs produisant des faisceaux d'électrons de très haute énergie (plusieurs Mev).

Il existe deux types d'accélérateurs (38 - 43) :

- les accélérateurs linéaires : les électrons sont accélérés par interaction avec une onde électromagnétique issue d'un tube électronique hyperfréquence (type Klystron). Ce type d'appareillage ne peut fonctionner en continu à cause des pertes énormes de chaleur par effet Joule. Le système fonctionne donc en impulsion. L'énergie des électrons obtenue est variable, elle peut aller jusqu'à 10 ou 20 Mev.

- les générateurs de Van de Graft qui utilisent une différence de potentiel pour accélérer les électrons.

En raison des très hauts voltages nécessaires, ce type de machine ne peut donner des énergies supérieures à 4 Mev.

Les faisceaux d'électrons ont une pénétration plus faible que les rayons γ (dans du plastique, dont la densité est voisine de 1, des électrons de 8 Mev, ont un parcours de 4 cm (43). Il a donc fallu faire des études minutieuses, de la géométrie d'irradiation, des produits à irradier pour garantir que tous les articles reçoivent la dose stérilisante. D'autre part, tous les paramètres de la machine doivent être contrôlés, car, étant donné le haut débit de dose, (1 Krad en 1 microseconde est un débit de dose facilement obtenu) des fluctuations de la durée des impulsions peuvent modifier de façon importante la dose (23).

Un accélérateur pour la radiostérilisation est composé : (43)

- du bloc d'irradiation placé dans une cellule possédant d'épais murs de béton assurant la protection.
- du pupitre de commande et des tableaux de contrôle placés à l'extérieur de la cellule.
- du convoyeur.

I.5. Unités de doses (30a - 38 - 53 - 161 - 299)

L'unité de radioactivité est le Curie qui est la quantité de matériel radioactif qui donne $3,7 \cdot 10^{10}$ désintégrations par seconde.

Pour les radiations électromagnétiques, l'unité d'exposition est le Roentgen (R) qui est définie comme la quantité de rayons X ou γ , telle que l'émission corpusculaire associée pour 0,001293 g d'air, produit des ions portant une charge électrique d'une unité électrostatique de n'importe quel signe. L'émission corpusculaire associée est celle des électrons éjectés, par effet photoélectrique ou effet Compton, des atomes d'air. La quantité d'air représente 1 cm³ à 0° et sous 760 mm de Mercure.

Pour une exposition donnée aux rayons X ou γ , la dose absorbée est fonction de l'énergie des photons et du nombre atomique du matériel absorbant. Ainsi 1 R de rayons X ou γ d'une énergie moyenne de 100 Kev dépose 87 ergs dans 1 gramme d'air et 100 ergs dans 1 gramme d'eau.

Le Roentgen ne peut être employé pour les radiations particulières. On utilise le "Roentgen equivalent physical" ou Rep qui est défini comme l'énergie perdue par les particules chargées, en produisant dans 0,001293 g d'air des ions portant une unité électrostatique d'électricité. Il est équivalent à 83 - 84 ergs/g dans l'air.

Pour éviter la confusion existant entre le R qui est plus une unité de radiation et le Rep qui mesure une quantité d'énergie, il a été proposé par un Comité International d'adopter une unité de dose basée sur le concept de dose absorbée. C'est le rad qui représente une énergie déposée de 100 ergs par gramme de milieu irradié ou de 10^{-5} joules/g.

La dose absorbée est régie par la formule :

$$D = \frac{\Delta_{ED}}{\Delta_m}$$

Δ_{ED} = énergie communiquée par le rayonnement,

Δ_m = masse de matière dans le volume irradié.

L'intérêt du rad, est qu'il est applicable à tous les rayonnements ionisants, qu'ils soient électromagnétiques ou corpusculaires.

Mais la quantité de radiation nécessaire pour déposer cette quantité d'énergie dépend de la nature du matériel irradié et de la longueur d'onde ou de l'énergie de la radiation.

I.6. - Dosimétrie (30a - 38 - 161)

La détermination de la dose peut se faire de deux façons :

- mesure des caractéristiques du faisceau de rayonnements ionisant et calcul de la dose absorbée correspondante,

- introduction dans le milieu d'un dosimètre et calcul de la dose à partir des modifications du dosimètre, en admettant que l'introduction du dosimètre ne perturbe pas l'énergie des électrons primaires ou secondaires qui traversent le matériel avant introduction du dosimètre.

Si la dose est exprimée en Roentgen, donc pour les radiations électromagnétiques, la meilleure méthode de mesure est la détermination du nombre de paires d'ions formées dans un volume de gaz.

Cette détermination se fait dans des chambres d'ionisations.

Les ions formés sont soumis à un champ électrique de telle sorte qu'il y a formation d'un courant. Lorsque le voltage est suffisamment haut le courant est constant parce que tous les ions sont attirés par les électrodes. Le nombre d'ions formés peut être calculé à partir de la valeur de ce courant de saturation. Une telle détermination n'est pas possible dans les liquides ou solides car un courant maximum ne peut jamais être obtenu.

Cette technique nécessite un appareillage important et ne peut donc être employée en routine, elle reste cependant une méthode de référence.

La dose en rad demande une mesure de l'énergie absorbée. La méthode de mesure la meilleure est la méthode calorimétrique qui est basée sur le principe que l'énergie déposée est convertie en chaleur. Mais cette technique délicate ne peut être utilisée couramment, elle est utilisée surtout comme méthode de référence.

En pratique, on utilise :

- . des dosimètres chimiques,
- . une dosimétrie par thermoluminescence,
- . des dosimètres solides.

. Les dosimètres chimiques :

+++++

Un grand nombre de systèmes a été proposé, mais la technique la plus utilisée est celle de Fricke qui est basée sur l'oxydation de sulfate ferreux en sulfate ferrique. La teneur en ions ferriques après irradiation est calculée à partir de la densité optique mesurée au spectrophotomètre à 305 $m\mu$.

Le dosimètre de Fricke n'est utilisable que dans un intervalle de doses étroit, 4000 à 40 000 rads environ.

D'autres dosimètres chimiques sont utilisés :

- dosimètre de Fricke modifié (addition de sulfate de cuivre)
- dosimètre au sulfate cerique (réduction du sulfate cerique en sulfate cerieux)
- dosimètre à l'acide oxalique : destruction de l'acide oxalique par irradiation.

. Dosimétrie par thermoluminescence :

+++++

qui utilise des détecteurs solides, dans lesquels l'absorption des rayons ionisants aboutit à des déplacements d'électrons et à un piégeage de l'énergie, qui est ensuite libérée sous forme de lumière par chauffage.

Les détecteurs sont constitués de poudre de fluorure de lithium ou de calcium incorporée, le plus souvent, à du teflon.

. Dosimètres solides :

+++++

Ils donnent des mesures moins précises et doivent être étalonnés sur une méthode de référence.

Les plus utilisés sont :

- les films photographiques surtout très employés pour la dosimétrie du personnel,
- des verres spéciaux au métaphosphate qui changent de couleur sous irradiation,
- les dosimètres en plexiglass dont l'absorption en UV est modifiée par irradiation,
- des feuilles de Mylar dont l'absorption à 325 m μ est modifiée par irradiation. Ce système permet de mesurer des doses très élevées.
- des colorants dispersés sous matière plastique tels que le Perspex rouge 400, qui changent de couleur sous rayonnement.

II - MECANISMES D'ACTION DES RADIATIONS IONISANTES SUR
LES CELLULES VIVANTES

II - MECANISMES D'ACTION DES RADIATIONS IONISANTES SUR LES CELLULES VIVANTES.

Les radiations ionisantes exercent différents effets sur les cellules vivantes : mutations, modifications biochimiques et physiologiques et surtout effet léthal par inhibition de la capacité de multiplication. La question s'est donc posée de savoir comment les radiations ionisantes qui, en fait, mettent en jeu des quantités d'énergie relativement faibles par rapport à d'autres agents (comme la chaleur par exemple), peuvent avoir des effets biologiques aussi importants. Cette question a suscité de nombreux travaux, cependant tous les mécanismes ne sont pas encore élucidés.

La sensibilité des cellules aux radiations ionisantes est différente, selon leur nature, elle augmente des virus aux cellules animales ; cependant les mécanismes d'action aboutissant aux effets biologiques sont semblables. La succession des étapes peut être schématisée de la façon suivante : (79a)

- interaction initiale avec production d'ionisations et d'excitations dont le temps de formation est de 10^{-17} à 10^{-15} secondes.
- modifications chimiques avec apparition de radicaux libres et de molécules excitées en 10^{-14} à 10^{-3} secondes.
- apparition de lésions, entre autres des protéines et des acides nucléiques, dans les secondes ou les heures suivant l'irradiation.
- effets biologiques en particulier effet léthal survenant dans les minutes, les heures ou les jours suivant l'irradiation.

Dans le premier chapitre, nous avons décrit superficiellement les mécanismes impliqués dans la première étape. Dans le prochain chapitre, nous étudierons la dernière étape, principalement l'effet léthal, nous envisageons donc maintenant les deux étapes intermédiaires.

II. 1. - Modifications chimiques - Actions directe et indirecte

II.1.1. Action directe - Action indirecte

Les modifications chimiques peuvent survenir :

- par action directe :

+++++

dont le concept a été formulé par Léa (209) (théorie de la cible), puis développé par d'autres auteurs dont Pollard et Coll. (256) et dont nous parlerons plus en détail par la suite.

Il y a action directe lorsque la molécule est modifiée par absorption directe de l'énergie quand la radiation traverse le milieu. La molécule (molécule organique, par exemple) sera excitée ou ionisée de la façon suivante (79a - 298) :



Il y a donc apparition de radicaux libres.

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules ayant un électron non apparié, sur une orbitale externe. Ils ont une durée de vie très courte, car ils réagissent avec d'autres radicaux ou d'autres molécules de façon à appairer leur électron solitaire ou à le transférer (réaction de transfert électronique).

- par action indirecte :

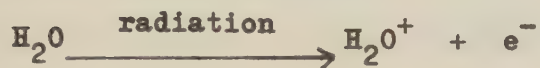
+++++

qui a été mise en évidence à la suite des travaux sur la radiolyse de l'eau de Weiss (349) et lorsqu'il a été montré que de nombreux facteurs tels que la teneur en eau, la concentration en oxygène, la température modifiaient l'action des radiations ionisantes.

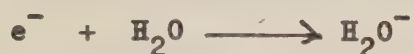
L'action est dite indirecte, quand l'énergie est transférée à la molécule étudiée, par l'intermédiaire d'une autre molécule qui est le plus souvent un radical libre.

Les radiations produisant des excitations et des ionisations au hasard, ce sont les molécules les plus abondantes qui ont le plus de chance d'être modifiées. Or, dans la matière vivante, il y a 70 à 90 % d'eau, ce sont donc les molécules d'eau qui absorbent une grande partie de l'énergie. Lorsque les molécules d'eau sont irradiées, des réactions en chaîne se produisent, aboutissant à la formation de radicaux libres. (30a - 79a - 94 - 298 - 299 - 349).

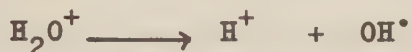
Ces réactions sont les suivantes :



L'électron libéré pourra se combiner avec une autre molécule d'eau pour donner une molécule négative.



La durée de vie des ions H_2O^+ et H_2O^- est de 10^{-10} à 10^{-11} secondes, ils se dissocient en radicaux libres.



Un autre mécanisme a été décrit par Samuel et Magel (30b) où l'électron libéré se recombine avec H_2O^+ pour donner une molécule très énergétique H_2O^* qui se dissocie immédiatement en $\text{H}^{\cdot} + \text{OH}^{\cdot}$; c'est à dire :



Chaque fois qu'une quantité d'énergie de 100 ev est absorbée, environ 4 molécules d'eau sont scindées en $\text{H}^{\cdot}$ et $\text{OH}^{\cdot}$. Les radicaux pourront diffuser dans le matériel irradié et réagir avec d'autres molécules. Les radicaux pourront réagir de différentes façons :

- soit en se recombinaut



- soit en réagissant entre eux



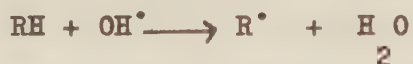
- soit en réagissant avec d'autres molécules d'eau



- soit en réagissant avec leurs produits de décomposition



Tous ces radicaux libres, en particulier les radicaux $\text{OH}^\bullet$ et $\text{H}^\bullet$ sont importants en radiobiologie, car ils peuvent se combiner avec l'oxygène pour donner des radicaux hydroperoxy, mais nous verrons plus loin l'importance de l'effet oxygène. Ils peuvent également, et c'est la base de l'action indirecte réagir avec les molécules organiques des cellules de la façon suivante :



II.1.2. - Modifications chimiques

Finalement, quel que soit le type d'action, directe ou indirecte, les modifications chimiques sont qualitativement les mêmes, avec donc apparition de molécules excitées et d'ions ou plutôt de radicaux libres, car le terme ion désigne plutôt les produits stables de la dissociation des sels.

Il a été montré que les molécules excitées ne jouaient pas un grand rôle dans les modifications chimiques des substances organiques ; aussi les altérations biologiques provoquées par les radiations ionisantes sont essentiellement dues aux ionisations (30b).

Les types de réactions aboutissant à des modifications chimiques sont les suivantes (30b) :

on a vu que quel que soit le type d'action (directe ou indirecte) il y a formation de radicaux libres $\text{R}^\bullet$, par perte d'un atome d'hydrogène.

Comme la plupart des composés organiques ont plusieurs atomes d'hydrogène, différents radicaux $\text{R}^\bullet$ peuvent se former, mais dans beaucoup de cas, certains atomes d'H sont plus labiles que d'autres.

En absence d'hydrogène

+++++

Les radicaux $R^\bullet$ peuvent réagir de différentes façons :

- ils peuvent se combiner à un autre radical libre :



Si X est un atome d'hydrogène, il y a donc restauration de la molécule.

- ils peuvent se dimeriser :



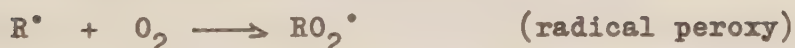
- il peut y avoir des réarrangements avec formation de nouvelles molécules :



En présence d'oxygène :

+++++

La réaction principale est :



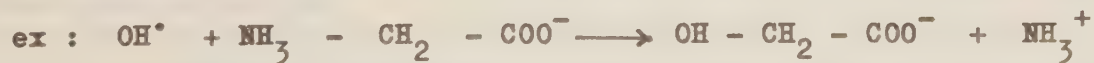
D'autres réactions peuvent se produire en particulier avec $OH^\bullet$.

Les radicaux $RO_2^\bullet$ ne peuvent jamais se dimeriser.

Les radicaux $RO_2^\bullet$ pourront réagir avec un autre molécule RH :



La principale réaction pour les aminoacides dissous dans l'eau, est la désamination



Glycine à pH 7



Cependant la cystéine n'est pas désaminée ; il y a formation de pont disulfure



Les groupes sulphydriques peuvent être également oxydés. On évalue le taux de modifications chimiques dues à l'irradiation par la quantité de molécules modifiées ou créées lorsqu'une quantité d'énergie de 100 ev est absorbée. Ce que l'on appelle la valeur de G.

On a calculé que dans un système contenant un seul type de molécule, une quantité d'énergie de 4 ev est nécessaire pour rompre une liaison forte dans une molécule organique. Si l'énergie du rayonnement est donc entièrement utilisée à cet effet, 100 ev pourront rompre 25 liaisons. En fait le maximum observé est de 10, la moyenne étant de 5 (30 b). Mais dans les systèmes contenant plusieurs composés, l'effet pourra être plus important par le processus de transfert d'énergie due à l'action indirecte. Un certain nombre d'expérimentation ont montré que le site de la modification chimique n'est pas nécessairement celui où l'énergie a été absorbée. Le transfert d'énergie peut se faire de molécule à molécule, mais aussi d'un point à un autre d'une même molécule.

Nous venons de voir quelques exemples de modifications chimiques induites par les radiations ionisantes, mais toutes les réactions se produisant entre l'absorption de l'énergie et l'apparition de lésions biologiques sont loin d'être connues.

II.2. - Lésions macromoléculaires et sites cellulaires sensibles

Les réactions touchant les petites molécules ne sont pas d'une très grande importance biologique, car seule une petite fraction peut être atteinte, sauf s'il y a formation de produits toxiques comme des peroxydes.

Par contre, les modifications des macromolécules sont très importantes. Ces modifications peuvent être de trois types (30 b) :

- rupture de chaîne aboutissant à une diminution du poids moléculaire.

- formation de liaisons nouvelles

- . intermoléculaires avec augmentation du poids moléculaire et modification de la solubilité (agrégation)
- . intramoléculaires : ponts se formant entre des groupes de la même molécule.

- modification de la structure secondaire ou tertiaire.

Nous allons donc envisager successivement les altérations qui peuvent se produire dans les différentes macromolécules.

II.2.1. - Altération des protéines

Les protéines sont les constituants majeurs du cytoplasme, certaines sont des composants structuraux, d'autres ont une activité catalytique (enzymes). De nombreux travaux ont été faits sur l'action des radiations sur les protéines et en particulier sur les enzymes.

Les modifications peuvent se produire aussi bien par action directe (protéines irradiées à l'état sec) que par action indirecte (irradiation de protéines en solution).

II.2.1.1. - Mécanismes généraux

Les effets des radiations sur les protéines peuvent être de deux types (103) :

- . modifications chimiques spécifiques,
- . modifications des propriétés physicochimiques.

. Les modifications chimiques touchant les acides aminés peuvent être variables :

- libération d'ammoniac à partir des groupes NH_2 libres, oxydation des groupes SH.

- formation de peroxydes (110). Augmentation du taux en alanine et apparition d'acide gammaaminoisobutyrique par décarboxylation des acides glutamiques et aspartiques.

Jayko et Garusson (187) ont montré qu'en présence d'oxygène, les liens peptidiques sont rompus, avec apparition de groupes : carbonyl et amide.

Alexander et Hamilton (6) ont montré qu'il y avait des modifications des acides aminés de la sérum albumine bovine après irradiation.

. Les modifications physicochimiques incluent (79b - 301) changement de solubilité, diminution du poids moléculaire, modifications des structures secondaires et tertiaires, apparition de liaisons nouvelles -liaisons hydrogène, ponts disulfures- aboutissant à un changement de la viscosité, du profil d'ultracentrifugation.

Les protéines peuvent devenir plus sensibles à d'autres traitements dénaturants : chaleur, agents chimiques. Après de fortes doses de radiation, les protéines tendent à former des agrégats.

II.2.1.2. - Altérations des protéines non enzymatiques

Relativement peu de travaux ont portés sur ce sujet.

Alexander et Hamilton ont étudié (5) les modifications physicochimiques de la sérum albumine bovine lorsqu'elle est irradiée à l'état sec. La constante de sédimentation augmente sans modification du poids moléculaire, ce qui traduit vraisemblablement une modification de la forme de la protéine. La sérum albumine humaine réagit de façon semblable. Lorsqu'une solution de fibrinogène est irradiée, il y a augmentation de la constante de sédimentation et de la viscosité (287).

II.2.1.3. - Altération des protéines enzymatiques

Etant donné le rôle important joué par les enzymes dans la physiologie cellulaire, l'inactivation des enzymes par les radiations a été beaucoup étudiée, mais les conditions d'études ont été différentes :

- irradiation d'enzymes purifiées cristallisées,
- irradiation d'enzymes purifiées en solution,
- étude de l'inactivation des enzymes dans leur environnement réel.

. Lorsque les enzymes sont cristallisées, les radiations ionisantes ne peuvent agir que par action directe. En général, l'inactivation en fonction de la dose se fait de façon exponentielle ; ceci a amené Léa (209) à élaboré sa théorie de la cible ("Target theory") qui a eu une grande influence en radiobiologie. Cette théorie peut être résumée de façon simplifiée ainsi :

Pour qu'il apparaisse des modifications chimiques ou fonctionnelles dans une molécule ou dans une cellule, il est nécessaire que des ionisations soient créées dans cette molécule ou dans une structure (cible) indispensable à la vie de la cellule.

Dans certains cas, un seul "événement" ou "coup", frappant la molécule sensible ou cible est suffisant pour aboutir à une altération (puisque la courbe dose-effet est une exponentielle).

Cette théorie aboutit à des conséquences qui ont pu être vérifiées : il est possible de calculer la taille et la forme de la molécule sensible ou cible en connaissant le nombre de molécules ou de cellules touchées par une dose donnée.

Lorsque la densité d'ionisations (donc le LET) change, la dose nécessaire pour aboutir au même effet biologique (efficacité biologique relative ou RBE) change également, ce qui permet donc de calculer la forme de la molécule. Le volume est calculé à partir de la dose inactivante, à condition que cette dernière ne varie pas en fonction du débit de dose.

L'inactivation observée suit en effet la relation suivante :

$$n/n_0 = e^{-SD} \quad \text{où } n/n_0 \text{ est le taux d'activité restant après une dose } D$$

S représente la section d'inactivation de la molécule, c'est à dire la chance pour qu'une particule l'inactive.

$$\text{Quand } n/n_0 = 0,37 = e^{-1}, \quad S = 1/D_{37}$$

Donc, à partir de la D_{37} , c'est à dire la dose qui laisse 37 % d'activité, on peut déterminer la taille de la cible.

Cette théorie a été appliquée par Léa et Coll. (209), par Pollard et Coll. (256) et a été vérifiée dans différents cas : destruction d'enzymes, de protéines à l'état sec, de virus, de bactéries.

En général, pour avoir une inactivation importante des enzymes irradiées à l'état sec, il faut des doses de l'ordre du mégarad ou du mégarep (103). Pollard et Coll. (256) n'observent aucune inactivation de la papaine, la pepsine et trypsine avec une dose de $3 \cdot 10^6$ reps. Bellamy (36) trouve une D 37 de $30 \cdot 10^6$ reps pour la trypsine.

Pollard et Coll. (256), Brustad (59) ont montré que l'inactivation des enzymes à l'état sec était fonction de la température d'irradiation et du LET.

. Inactivation des enzymes en solution

Les courbes d'inactivation sont également exponentielles, mais les doses nécessaires pour obtenir une inactivation substantielle sont beaucoup plus faibles, de l'ordre de quelques centaines de rads.

Différentes observations indiquent qu'en solution aqueuse, le concept de la théorie de la cible n'est pas applicable et montrent qu'il y a souvent action indirecte. La D 37 augmente quand la concentration en enzyme augmente (quand la concentration en molécules d'eau diminue par rapport au nombre de molécules d'enzymes, l'inactivation est plus difficile). Par exemple, la D 37 de la pepsine est de $0,042 \cdot 10^6$ rads pour une concentration de 0,1 mg/ml et de $0,34 \cdot 10^6$ rads pour une concentration de 1 mg/ml (256).

- l'inactivation est plus faible quand les solutions d'enzyme sont irradiées à basse température (diminution de la migration des radicaux libres) (256).

- l'addition de substances contenant des thiols : thiorurée cystéine, glutathion, hydrosulfite, a un effet protecteur sur les enzymes ; ceci a été montré par Dale (95) avec la Carboxypeptidase et la D amino-acide-oxydase, puis confirmé avec d'autres enzymes (30 d). Cet effet protecteur serait dû à la capacité de ces substances de fixer les radicaux libres.

A titre indicatif, voici quelques sensibilités trouvées.

La catalase à la concentration de 1 mg/ml est inactivée par une dose de 25 kiloreps (36). La trypsine ($5 \cdot 10^{-6}$ M) a une D 37 moyenne d'environ 18 Krads, mais cette D 37 varie avec la nature du substrat employé (Lynn, 224). La chymotrypsine (à la concentration de $5 \cdot 10^{-6}$ M) a une D 37 de 9 Krads (223), la papaine une D 37 de 10 Krads (225). Enfin Lynn (226) montre qu'une dose de 16 Krads aboutit à une perte d'activité de la catalase ($1,5 \cdot 10^{-6}$ M) de 8 %, cette perte d'activité étant en corrélation avec la destruction de l'hème.

. Inactivation des enzymes dans les cellules et les tissus.

Pour un grand nombre d'enzymes, il faut une dose supérieure à 1 Mrad pour avoir une inactivation appréciable. L'inactivation est le résultat de différents événements comprenant des effets directs, des effets indirects et des effets protecteurs dus à l'environnement (103). Mais, in vivo l'interprétation se complique par le fait qu'on ne sait pas si la modification de l'activité de l'enzyme est due à une altération directe ou secondaire à l'altération d'autres systèmes biologiques (79b).

D'autre part, les systèmes enzymatiques sont très nombreux et beaucoup d'enzymes sont synthétisées en continu, de telle sorte qu'une inactivation d'une fraction du potentiel enzymatique n'est pas suivie d'un effet biologique mesurable. Par contre, certaines enzymes sont présentes en petites quantités, si bien que leur inactivation peut être lourde de conséquences pour la cellule (79b).

En conclusion, les études sur l'inactivation des enzymes par les radiations ionisantes faites jusqu'à ce jour montrent que les doses inactivantes, que ce soit in vivo, ou in vitro sont souvent très élevées et sont supérieures aux doses léthales pour beaucoup de cellules.

II.2.2. Action sur les acides nucléiques

D'après la théorie de la cible de Léa, nous avons vu qu'une seule ionisation frappant une molécule (cible) dans une cellule peut aboutir à un effet léthal, à condition que cette molécule soit unique et indispensable à la vie de la cellule. Aussi l'intérêt s'est porté sur les molécules pouvant correspondre à cette description et en particulier les acides nucléiques.

II.2.2.1. - Action sur les acides désoxyribonucléiques (ADN)

De nombreux travaux ont été faits sur ce sujet, en particulier ces dernières années. Ces travaux ont étudié d'une part les mécanismes chimiques par lesquels les radiations ionisantes peuvent créer des altérations des acides nucléiques et d'autre part les types de lésions que l'on pouvait mettre en évidence, ainsi que les conséquences sur les propriétés fonctionnelles des ADN.

II.2.2.1.1. - Mécanismes chimiques d'altération : *****

Ces mécanismes ont été étudiés in vitro sur des systèmes modèles qui peuvent être définis et qui permettent des observations quantitatives. Les modèles consistent soit en de l'ADN purifié, irradié à l'état solide ou en solutions aqueuses diluées, soit en constituants de l'ADN, tels que bases puriques ou pyrimidiques, nucléosides et nucléotides.

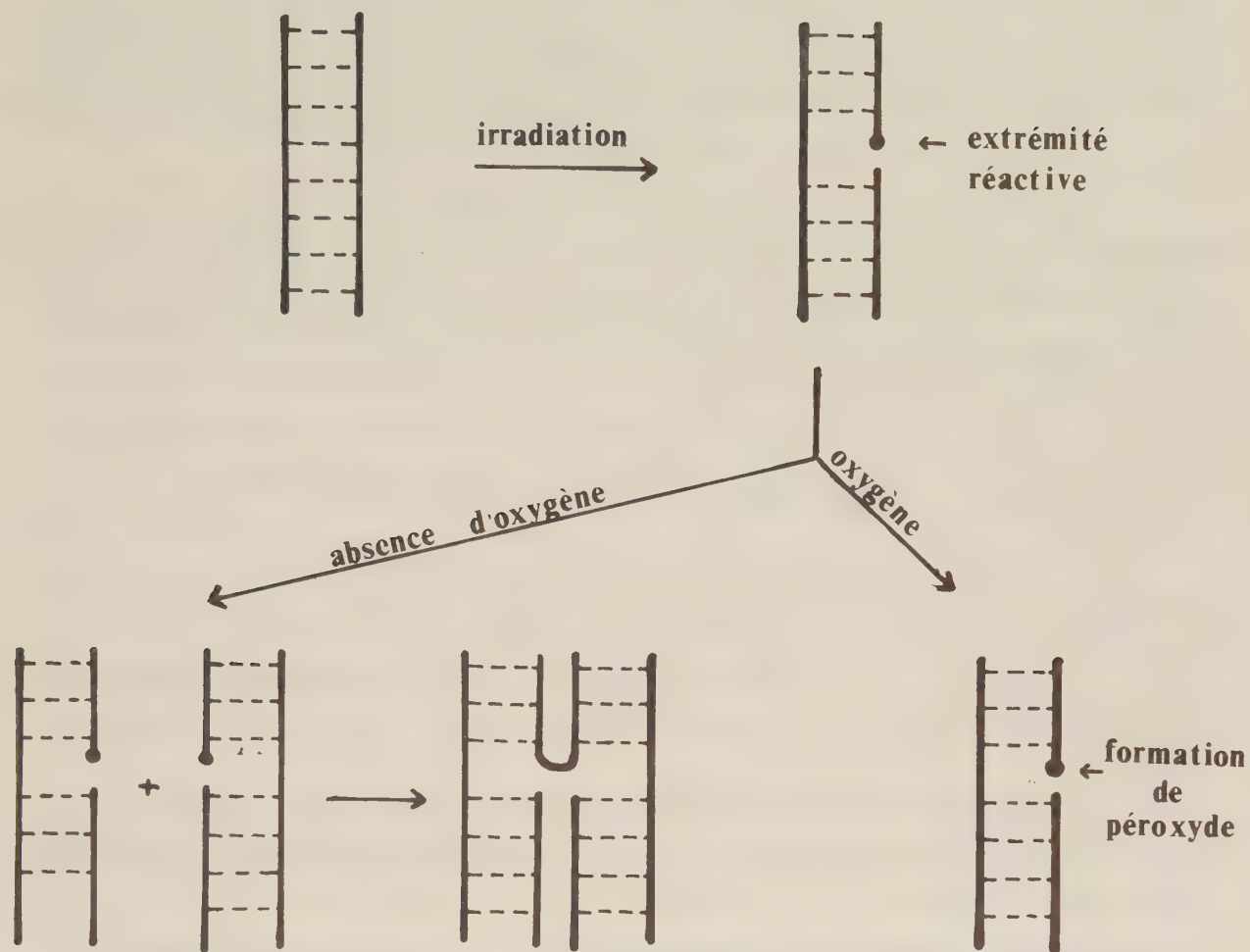
Les premières investigations basées sur les modifications des propriétés physicochimiques de l'ADN (diminution ou augmentation de la viscosité, modification de la constante de sédimentation) permettaient de conclure que la lésion était une rupture mono ou bicaténaire. En 1962, Bacq et Alexander (30d) proposaient le schéma suivant (figure n° 2) des différentes réactions pouvant se produire :

- lorsqu'il y a scission d'un seul brin, deux réactions peuvent se produire selon qu'il y a présence ou non d'oxygène. En absence d'oxygène la rupture se fait de telle façon qu'une des extrémités est réactive et peut se lier avec un autre pour former un pont ("Crosslink"). Par contre, en présence d'oxygène, l'extrémité réactive se transforme en peroxyde et ne peut entrer dans une liaison pour former un pont.

- rupture des 2 brins : statistiquement, il surviendrait une rupture bicaténaire pour 70 ruptures monocaténaires.

Par l'utilisation de nouvelles techniques d'étude comme la résonance paramagnétique électronique (RPE) qui permet d'étudier les radicaux libres se formant sous rayonnement, les mécanismes de radiolyse des acides nucléiques sont un peu mieux connus (113 - 114 - 144 - 239 - 240 - 242 - 263).

1 - Rupture monocaténaire de l'ADN



2 - Rupture bicaténaire

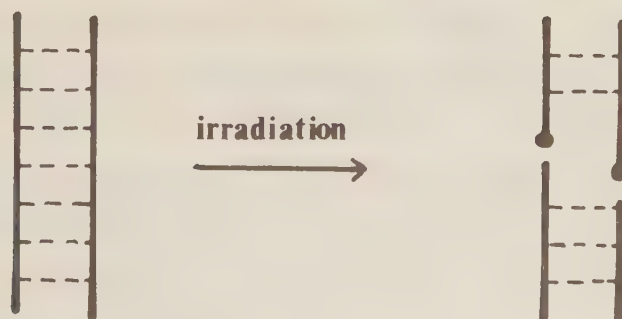
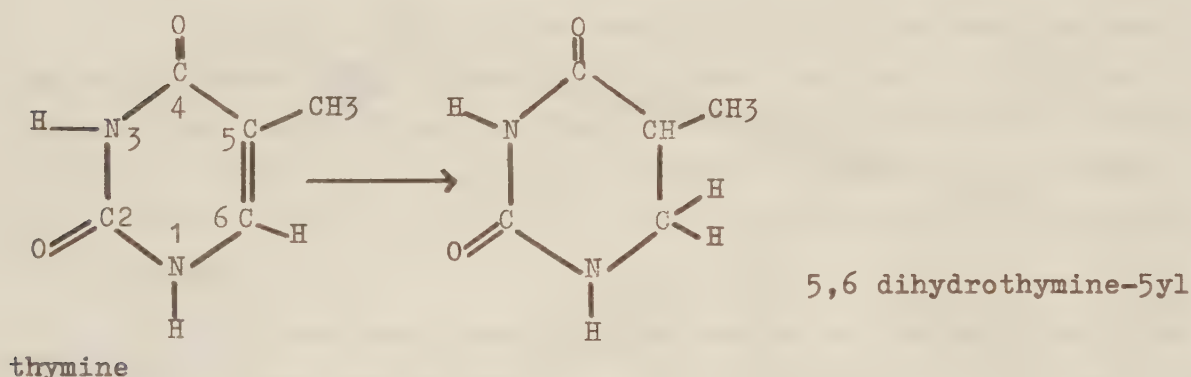


Figure 2 : ACTION DES RADIATIONS IONISANTES SUR LES ADN

Lorsque de l'ADN est irradié en solution aqueuse diluée, les principales lésions observées sont des dégradations des bases puriques et pyrimidiques et des sucres, aboutissant à des ruptures des chaînes. Il est apparu que les bases sont des constituants particulièrement sensibles, surtout les bases pyrimidiques.

Pour les bases pyrimidiques, le site d'attaque est la double liaison 5-6. En présence de radicaux $H^\bullet$, il y a addition d'un atome d'hydrogène sur la double liaison avec formation du radical 5,6 dihydro-5yl.

exemple avec la thymine :



Lorsqu'il y a action de radicaux $OH^\bullet$, il y a alors addition de OH sur la double liaison et en présence d'oxygène formation de 5 hydroxy-6 hydroperoxyde.

In vivo, c'est la thymine qui est la base la plus sensible.

Les bases puriques sont plus stables (environ 2 fois plus que les bases pyrimidiques); Les radicaux libres sont formés selon les mêmes réactions, le site d'attaque préférentiel étant la double liaison $N_7 = C_8$.

Pour les sucres, la formation des radicaux libres se fait par libération des atomes d'hydrogène des carbones C'_1 et C'_5 , l'action de radicaux $OH^\bullet$ sur le carbone 1' aboutissant à une oxydation. La formation de ces radicaux libres entraîne la rupture des liaisons N glycosidiques et phosphodiester et donc une modification de la structure macromoléculaire.

II.2.2.1.2. - Différents types de lésions et conséquences

sur les propriétés fonctionnelles.

Différents travaux ont essayé de mettre en évidence les lésions de l'ADN lorsque celui-ci est irradié in situ (c'est à dire

dans l'environnement cellulaire). Friefelder (133) a étudié le nombre de scissions mono et bicaténares se produisant chez l'ADN du coliphage T₇ irradié par des rayons X, par extraction de l'ADN et analyse en ultracentrifugation. L'inactivation du phage est proportionnelle au taux de ruptures bicaténares.

Des travaux similaires ont été faits chez les bactéries. Mac Grath et Williams (227) ont étudié la proportion de ruptures sur une seule chaîne chez E. coli. Des doses de 20 Krads produisent de telles ruptures, leur nombre étant proportionnel à la dose. Les auteurs font en outre une observation intéressante. Si E. coli B/r (mutant résistant) est incubé à 37° pendant 40 mn après l'irradiation et avant d'extraire l'ADN, il n'est plus possible de mettre en évidence des ruptures d'une seule chaîne.

Par contre, avec E. coli Bs-1 (mutant radiosensible) un tel phénomène n'est pas observé. Les auteurs concluent donc que la souche E. coli B/r possède un mécanisme de réparation des ruptures monocaténares. Cette capacité de réparation a également été mise en évidence chez E. coli K12.

Kaplan (195 - 196) a étudié la formation de ruptures bicaténares sur une souche d'E. coli K12. Ces ruptures sont mises en évidence après des doses allant de 5 à 30 Krads.

Une incubation de 40 mn à 37° après irradiation ne montre aucune réparation des lésions et aucune augmentation de viabilité des cellules. Les traitements connus pour augmenter la radiosensibilité cellulaire entraînent une augmentation des doubles ruptures, alors qu'à l'inverse des traitements diminuant la radiosensibilité (composés sulfhydriques) aboutissent à une diminution de ces scissions bicaténares. Il semble donc que la principale lésion léthale soit une rupture touchant les 2 brin d'ADN.

Mais, chez les bactéries, un phénomène particulier de dégradation de l'ADN a été observé. Le premier, Stuy (310) a montré qu'après irradiation chez Hemophilus influenzae et E. coli, une dégradation extensive de l'ADN se produisait.

Pollard et Achey (257 - 258) chez la souche d'E. coli 15 T⁻ L⁻ ont trouvé qu'approximativement 50 % de l'ADN était dégradé et que ce phénomène est potentialisé en présence d'oxygène. Quand la souche est

chauffée à une température supérieure à 52° pendant 10 mn la dégradation est inhibée.

De nombreuses études ont été faites sur ce sujet, il semble que le processus de dégradation soit enzymatique et que son importance varie avec la souche (Pollard, 259). Le processus de dégradation est rapide (des produits de dégradation libérés par la cellule peuvent être mis en évidence dans la minute suivant l'irradiation).

D'autres travaux ont étudié l'action des rayonnements ionisants sur les propriétés fonctionnelles des ADN, c'est à dire la répllication et la transcription.

Différentes études (257 - 258 - 259) par utilisation d'une technique d'incorporation de thymine marquée ont montré que l'irradiation modifiait la synthèse de l'ADN chez E. coli. Avec une dose de 5 Krads, le taux de synthèse n'est pas modifié pendant 60 mn environ, mais il diminue par la suite. Une dose de 10 Krads donne un effet plus marqué, particulièrement au début. Enfin, une dose de 20 Krads entraîne une inhibition totale de la synthèse dès le début. Tout ceci a été observé lorsque les germes sont irradiés en aérobiose.

En anaérobiose, l'effet est moins marqué, une diminution de synthèse nette n'est observée qu'avec une dose de 20 Krads. Billen et Coll. (1 - 40) ont montré également que non seulement le taux de synthèse est diminué, mais aussi que le mécanisme de répllication est modifié.

Des travaux de Pollard et Coll. (259 - 260) ont montré également que l'irradiation diminuait le taux de transcription en ARN messager.

II.2.2.2. - Action sur les acides ribonucléiques (ARN)

Les mécanismes radiochimiques d'inactivation sont très voisins, de ceux décrits pour les ADN.

Pollard et Barone, (cités par Ginoza, 144) ont trouvé que les ARN messagers, responsables de la synthèse de la β galactosidase chez E. coli, étaient assez peu sensibles : une dose de 12 Krads n'aboutit à aucun effet sur les fonctions de cet ARN m.

Fujita et Coll. (135) ont observé que le taux de synthèse de ARN ribosomal d'E. coli était diminué par irradiation γ , Ceci étant surtout dû à un retard de maturation. Ekert et Pattein (118) ont étudié l'action des rayons γ sur les propriétés d'adaptation et de transfert des ribosomes d'E. coli. Ces deux propriétés sont inactivées selon une fonction exponentielle, mais elles ont une sensibilité différente.

Enfin, l'action des rayons γ sur les propriétés des ARN de transfert a été étudiée par Ekert et Latarget (119), les différentes fonctions des t ARN (propriétés acceptrices, d'adaptation, de transfert) sont inactivées de façon exponentielle.

II.2.3. - Principal site cellulaire sensible.

Différentes théories ont été proposées pour expliquer l'effet léthal des radiations (196) :

- anomalies de la phosphorylation oxydative
- altération des composants de la membrane (hypothèse d'Alexander)

En fait, il apparaît clairement que les lésions léthales sont celles touchant le génome.

Kaplan et Moses (194) ont montré que la radiosensibilité des virus et bactéries est fonction de la teneur en acide nucléique, de la ploïdie et de la structure de l'ADN (mono ou bicaténaire).

D'autre part, la radiosensibilité de 8 espèces différentes de bactéries a été trouvée être en relation directe avec la teneur en guanine-cytosine de leur ADN (Kaplan et Zavarine, 193). La sensibilité varie de 3 à 4 fois quand le G-C % passe de 34 à 67 %. Cependant cette corrélation n'est pas toujours retrouvée. Chez les virus à ADN et ARN, il a été montré que l'altération de leur acide nucléique entraîne la perte du pouvoir infectieux.

Nous avons vu d'autre part, que l'irradiation modifie de façon importante l'intégrité de l'ADN avec des doses d'irradiation très faibles de l'ordre du Krad.

III - EFFETS DES RADIATIONS SUR LES MICROORGANISMES

III - EFFETS DES RADIATIONS SUR LES MICROORGANISMES

III.1. - Effet léthal

Peude temps après la découverte des rayons X par Roentgen, des chercheurs ont essayé de voir s'ils pouvaient avoir un effet bactéricide. Dans certains cas, les résultats furent négatifs. Cependant Rieder (280) en 1889 observe que différentes cultures de bactéries (Bacillus anthracis, Escherichia coli, Corynebacterium diphtheriae, Mycobacterium tuberculosis, Staphylococcus aureus, Vibrio cholerae) sont tuées après une exposition de 40 à 60 mn.

Wyckoff en 1930 (356) a trouvé qu'il existait une relation exponentielle entre la dose et le rapport N (nombre de germes survivants) sur No (nombre de germes initial).

Depuis, un grand nombre de travaux ont étudié l'effet léthal des rayons ionisants (rayons X d'abord, puis flux d'électrons et rayons γ) sur les microorganismes et ont essayé d'expliquer les mécanismes aboutissant à cet effet.

Nous verrons par la suite que les bactéries irradiées conservent certaines propriétés physiologiques, aussi il est important de définir dans ce cas la létalité. C'est en fait la perte, par la cellule, de la capacité de se reproduire et se multiplier et donc pour les bactéries de donner des colonies visibles.

Il est habituel de présenter les résultats sous forme de courbe de survie, obtenue en portant le nombre de survivants N/No en fonction de la dose, en coordonnées semi logarithmiques. Trois types de courbes sont en général obtenues (53 - 155 - 229) (figure 3).

La courbe 1 montre qu'il existe une relation exponentielle entre le nombre de survivants et la dose, c'est à dire que tout accroissement de la dose s'accompagne d'une augmentation proportionnelle de l'effet.

La relation mathématique correspondante est :

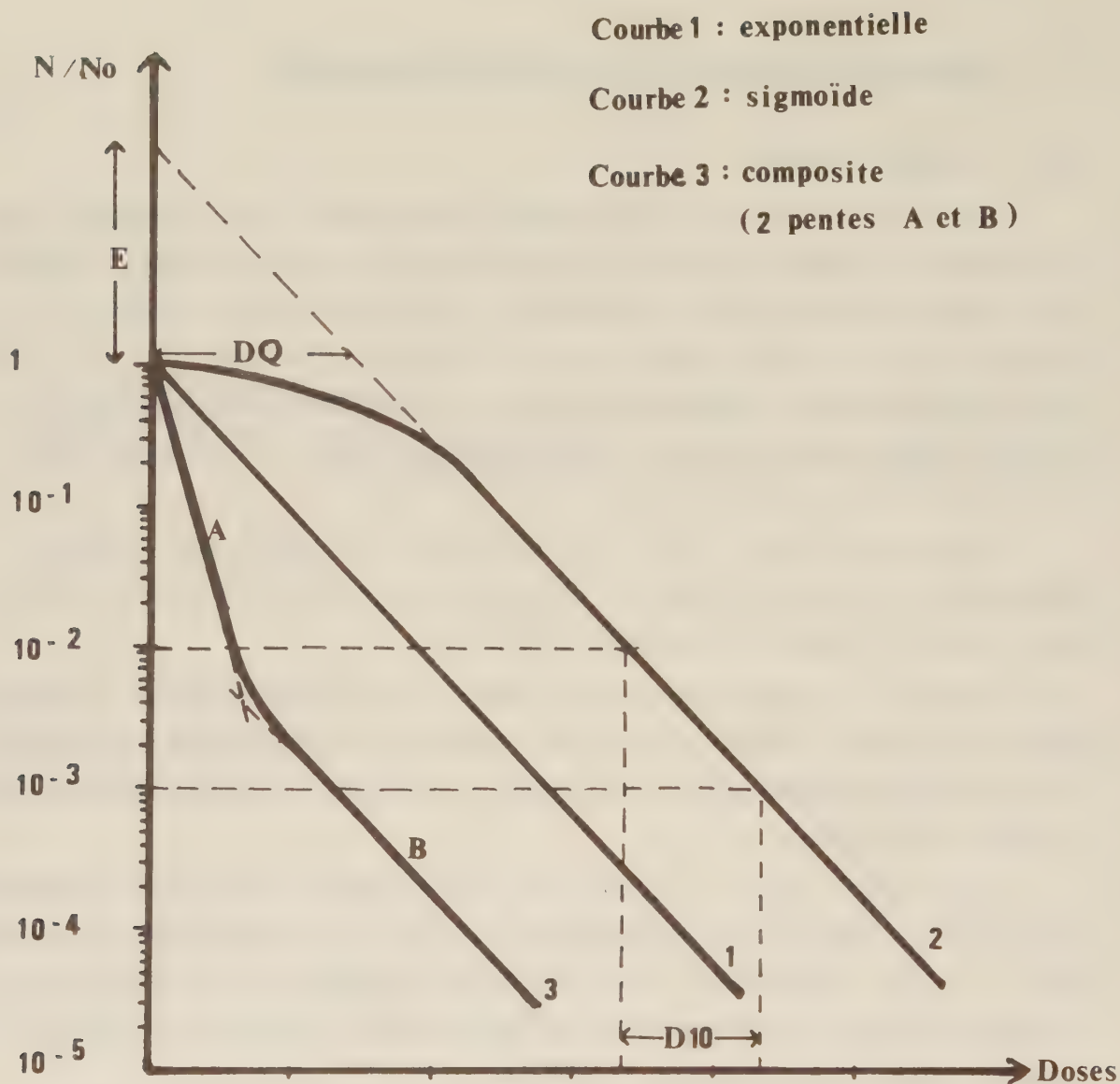
$$\frac{N}{N_0} = e^{-KD}$$

où N = nombre de survivants

No = nombre initial de germes

D = dose

K = pente de la courbe exprimée en inverse de l'unité de dose.



- N_0 : Nombre initial de germes
 N : Nombre de germes à la dose considérée
 DQ : Valeur de l'épaule
 E : Nombre d'extrapolations ou nombre de cibles
 D10 : Dose qui inactive la population par un facteur 10

Figure 3 : DIFFERENTS TYPES DE COURBES DE SURVIE

Selon la théorie de la cible, une relation exponentielle signifie qu'il suffit d'un "évènement" pour provoquer la mort d'une bactérie.

On constate en utilisant cette formule qu'avec une dose de $1/K$ qui induit un évènement léthal par bactérie, il y a un nombre de survivants : $\frac{N}{N_0} = e^{-1} = 0,37$

Donc la dose qui laisse 37 % de survivants* est la dose qui aboutit à un coup léthal par cellule. Cette dose est une donnée essentielle dans la théorie de la cible car elle permet de calculer le volume sensible ou le volume de la cible.

La courbe 2 est la courbe dite sigmoïde, un épaulement est observé aux faibles doses, la courbe devenant exponentielle aux doses plus fortes.

La formule de cette courbe est la suivante (267) :

$$\frac{N}{N_0} = 1 - (1 - e^{-KD})^n$$

où n est la multiplicité ou le nombre de cibles

Cette courbe est dite à "coups ou cibles multiples". Deux interprétations sont possibles (229) :

- chaque cellule nécessite plusieurs "coups" ou évènements pour être inactivée, c'est à dire qu'il faut plusieurs fois le même évènement dans une structure donnée pour obtenir une inactivation.

- les cellules sont groupées en amas ; il suffit donc d'une cellule intacte par amas pour qu'il y ait formation d'une colonie. Pour observer une diminution du nombre de colonies, il faut donc que toutes les cellules de l'amas soient tuées. La multiplicité n représente donc le nombre de cellules par amas.

Cependant Alper et Gillies (cités par Bridges, 53) pensent que l'interprétation basée sur l'existence de cibles multiples n'est pas valable car n peut varier de façon importante selon les conditions de culture après irradiation. Ils suggèrent donc d'utiliser le terme de "nombre d'extrapolation" plutôt que cibles multiples.

* Cette dose est appelée D_{37} ou D_0

Sur le graphique, on peut obtenir la multiplicité ou encore le nombre d'extrapolation (E) en prolongeant la partie rectiligne de la courbe jusqu'à l'axe des ordonnées.

La dose D_q représente l'importance de l'épaulement (53).

La courbe 3 est une courbe dite composite ou exponentielle brisée. Cette courbe est composée de 2 exponentielles.

L'explication la plus simple est que la population bien qu'homogène phénotypiquement est composée de deux types de cellules de radiosensibilité différente (53 - 229).

L'hétérogénéité peut être d'ordre génétique, c'est à dire que les individus radiorésistants sont des mutants. On peut le vérifier en récupérant les survivants aux fortes doses et en établissant leur courbe de survie dans les mêmes conditions que celles de la première expérience. Si la pente de cette courbe est la même que celle de la partie B de la première courbe, c'est qu'il y avait bien des mutants radiorésistants que l'on a pu sélectionner. Mais l'hétérogénéité peut être également physiologique (229). Dans ce cas, les survivants aux fortes doses donnent la même courbe brisée que la population initiale.

Pour exprimer la radiosensibilité des microorganismes, la méthode la plus utilisée et la plus précise est de déterminer graphiquement la D_{37} ou D_0 (dose qui laisse 37 % de survivants) ou la D_{10} qui correspond à la dose qui laisse 10 % de survivants, c'est à dire qui inactive 90 % de la population bactérienne. D_{37} et D_{10} ne peuvent être déterminées qu'à partir d'une courbe de survie exponentielle. La D_{37} a été surtout utilisée pour déterminer le volume de la cible sensible dans le cadre de la théorie de la cible. Actuellement, pour l'expression de la radiosensibilité, on utilise principalement la D_{10} .

La D_{10} peut être déterminée par une autre méthode, mais qui est moins précise que la mesure graphique à partir de la courbe de survie. Cette méthode est basée sur le principe suivant : des échantillons à tester (tubes, conserves alimentaires) sont contaminés avec une suspension riche de bactéries. Ces échantillons sont ensuite irradiés à différentes doses, puis mis en culture pour détecter la présence ou non de survivants.

Schmidt et Nank (288) calculent la D 10 avec l'équation suivante :

$$D\ 10 = \frac{Dx}{\log M - \log S}$$

où Dx = dose appliquée (Mrads)

M = nombre de germes inoculés par échantillons

S = nombre d'échantillons contenant des survivants à la dose x

Cette formule permet de faire une estimation de la D10, mais elle présente un inconvénient, c'est que la D 10 calculée augmente légèrement quand la dose appliquée augmente, or par définition, la D 10 est une valeur qui doit rester constante quand la cinétique d'inactivation est une exponentielle.

Aussi Anelis et Coll. (18) ont proposé de modifier cette formule qui devient :

$$D\ 10 = \frac{Dx}{\log M - \log \left(2,303\ n \left(\log \frac{n}{q} \right) \right)}$$

où Dx = dose d'irradiation délivrée

M = nombre de germes inoculés par échantillons

n = nombre total d'échantillons traités avec dose x

q = nombre d'échantillons stériles à la dose x

Une autre équation a également été proposée par Stumbo (309) :

$$D\ 10 = \frac{Dx}{\log A - \log B}$$

Dx = dose donnant des échantillons stériles et non stériles

A = nombre total d'échantillons testés à cette dose, multiplié par le nombre de bactéries inoculées par échantillons

B = nombre de survivants à cette dose en supposant qu'il y a un survivant par échantillons non stériles.

III. 2. - Effets des rayons ionisants sur la physiologie et la structure des microorganismes.

III.2.1. - Respiration

Les premiers Billen et Coll. (39) ont montré que la "respiration" d'E. coli continue pendant plusieurs heures après irradiation . Powell et Pollard (266) n'ont observé aucune inactivation des enzymes respiratoires de Bacillus subtilis après une dose d'irradiation de $1,4 \cdot 10^5$ R de rayons X.

Bonet-Maury et Coll. (42) ont mesuré la respiration d'E. coli au respiromètre de Warburg. Avec une dose de 0,6 Mrad de rayons X (soit 10 fois la dose stérilisante minima) la respiration reste encore le quart de celle des témoins. Un résultat similaire est obtenu avec Salmonella typhi. Mycobacterium tuberculosis irradié à 0,1 Mrad conserve pendant 4 jours 20 % de ses échanges respiratoires. Schuster (291) a mesuré la consommation en oxygène après irradiation, de plusieurs souches d'E. coli. Cette consommation est encore de 72 à 92 %, 20 mn après une dose de 200 Krads. L'auteur montre également que les souches dites sensibles, par exemple E. coli Bs-1 (c'est à dire les souches dont la multiplication est inhibée à faibles doses) ont un système respiratoire très résistant à l'irradiation.

Il ressort de l'ensemble de ces résultats que les bactéries irradiées et dont le pouvoir de multiplication est inhibé gardent encore une activité métabolique pendant un certain temps après l'irradiation.

III.2.2. - Mobilité

Après Léa et Coll. (208) et Grainger (151) qui avaient observé que la mobilité des bactéries persistait après irradiation, Bonet-Maury et Coll. (42) ont montré que E. coli et Salmonella typhi avaient une mobilité intacte après irradiation avec une dose supérieure à la dose stérilisante. Après une dose de 2 Mrads, Salmonella typhi a même une mobilité plus importante que celle des témoins.

III.2.3. - Effets sur la structure antigénique

La résistance aux radiations des antigènes des microorganismes

a fait l'objet d'un certain nombre de travaux, surtout dans le but de préparer des vaccins.

III.2.3.1. - Antigènes bactériens

Troitsky et Coll. (336) ont étudié les propriétés antigéniques de suspension de Shigella dysenteriae et de Salmonella typhi inactivées par rayonnement gamma. Après une dose d'irradiation de 1,5 Mrad qui assure une inactivation totale, les propriétés antigéniques sont parfaitement conservées. En effet, ces "radio-vaccins" injectés chez l'animal assurent une production d'anticorps à des taux semblables à ceux obtenus avec des vaccins formolés.

Tumanyan et Coll. (337) obtiennent avec des préparations bactériennes de Shigella dysenteriae et de Salmonella typhi des résultats superposables.

Bonet-Maury et Coll. (42) ont préparé des radio-vaccins de différentes espèces bactériennes. E. coli, vibrio cholerae ogawa et inaba, irradiés respectivement à 0,6 Mrad et 0,15 Mrad, ont le même pouvoir protecteur chez l'animal que les vaccins chauffés. Salmonella typhi Ty2 inactivée par une dose de 0,6 Mrad conserve l'intégrité sérologique des antigènes O, H et Vi.

Cette préparation bactérienne produit une montée d'anticorps (O, H, Vi) comparable à celle obtenue avec des bactéries vivantes. Erdman, Thatcher et MacQueen (125) ne détectent aucune modification sérologique de Salmonella gallinarum après 14 irradiations successives avec 0,2 Mrep.

Licciardello et Coll. (218) ont étudié les effets d'irradiations répétées (irradiation à 75 kd, puis culture des survivants, nouvelle irradiation, etc...), sur la structure antigénique de différents sérotypes de Salmonella (S. typhimurium, S. newport, S. thompson, S. heidelberg). Après 15 ou 20 cycles d'irradiation les auteurs constatent que les souches radiorésistantes ainsi sélectionnées agglutinent beaucoup plus faiblement que les souches parentales, cependant un typage sérologique de ces souches a toujours été possible.

Des travaux similaires de Corry et Roberts (88) ont été réalisés avec des souches de S. typhimurium, S. dublin, S. senftenberg. Après 13 cycles d'irradiation laissant chaque fois 0,1 % de survivants les colonies obtenues sont souvent rugueuses. Les antigènes H sont toujours identifiables, les antigènes O également pour les souches partiellement rugueuses. Mais pour S. typhimurium les antigènes O4 et O5 ne peuvent pas être mis en évidence ; si bien que la souche, si elle est encore reconnue sérologiquement comme une Salmonella, ne peut être sérotypée comme Salmonella typhimurium.

Negretti (241) a montré que des suspensions de Escherichia coli, Proteus vulgaris, Staphylococcus aureus, Streptococcus ovalis, inactivées par irradiation gamma conservaient leur pouvoir immunisant. Nous même (332) avons étudié le pouvoir immunogène de deux souches de Staphylococcus inactivées par irradiation. Les antigènes de types ne paraissent pas modifiés par irradiation puisque le pouvoir immunogène était parfaitement conservé. Par contre, après irradiation, il n'a pas été possible d'obtenir d'anticorps antipolysaccharide A (antigène de groupe).

L'irradiation entraîne donc des altérations de cet antigène ; cependant, il faut signaler que son pouvoir précipitant est parfaitement conservé.

Il apparaît donc que dans l'ensemble, les antigènes sont peu modifiés après une irradiation. Cependant, des irradiations répétées peuvent dans certains cas modifier la structure antigénique.

III.2.3.2. - Antigènes viraux

L'utilisation des rayons γ pour la préparation d'antigènes viraux non infectieux a été étudiée par Polley (261 - 262). L'irradiation détruit le pouvoir infectieux de Myxovirus influenzae A et B, du virus ourlien, de l'herpesvirus et de la vaccine, tout en gardant la plus grande partie de l'activité fixant le complément. La cinétique de l'irradiation de ces virus permet de calculer la dose de radiation nécessaire pour inactiver l'infectivité en gardant le maximum d'antigénicité.

L'irradiation γ apparaît supérieure au traitement par le formol pour la préparation d'antigène de l'herpès qui est particulièrement sensible à la chaleur et au formol.

Par contre, l'hémagglutinine des Myxovirus influenzae A et B est sensible au rayonnement γ puisque dans les préparations purifiées et irradiées en sérum physiologique, elle est détruite plus rapidement que l'infectivité. Cependant l'addition d'histidine, de paraaminohippurate de Na, d'acide ascorbique ou de cystine à la suspension saline permet d'inverser les résultats, c'est à dire d'inactiver l'infectivité tout en conservant les propriétés hémagglutinantes.

Ghys et Coll. (140) ont fait des travaux similaires sur des souches de Myxovirus influenzae A1, A2 et B. L'irradiation (rayons γ) a été pratiquée sur des suspensions virales dans du liquide allantoïque. Le pouvoir hémagglutinant n'a jamais été détruit, même avec de très fortes doses (4 Mrads) largement supérieures aux doses minima stérilisantes.

De Flora et Badolati (101) n'ont observé aucune inactivation des antigènes fixant le complément, de l'hémagglutinine et de la neuraminidase du virus A2/HONG KONG, irradié dans du liquide allantoïque à une dose de 3 Mrads, alors que l'infectivité est complètement supprimée.

Le virus de la vaccine garde des propriétés immunogènes s'il est irradié avec une dose de 0,6 Mrad, par contre avec 1 Mrad, l'immunogénicité est détruite (Kaplan, 191).

Pour le poliovirus, Dick et Coll. (108) ont pu inactiver des suspensions virales non purifiées en conservant une partie de l'antigénicité du virus, alors que Bonet-Maury et Coll. (42) ont constaté que le pouvoir immunogène était pratiquement nul après une dose d'irradiation de 4 Mrads, dose nécessaire pour inactiver le pouvoir infectieux.

Reitman (278 - 279) a montré que des préparations non infectieuses de virus de l'encéphalomyélite équine du Vénézuéla (VEE virus)

peuvent être préparées par irradiation avec conservation d'un bon titre hémagglutinant. Ces préparations possèdent des propriétés immunogènes excellentes puisqu'elles font apparaître chez l'animal des anticorps neutralisant et inhibant l'hémagglutination.

Les travaux de Gruber (154) toujours sur le VEE aboutissent à des résultats identiques.

Enfin les résultats de Frescura et Vivoli (132) sur les propriétés de fixation du complément du virus de la fièvre aphteuse, après inactivation par irradiation gamma, montrent que l'antigénicité est parfaitement conservée.

Les antigènes viraux semblent donc résister assez bien aux rayonnements ionisants. L'hémagglutinine des Myxovirus influenzae n'est pas inactivée si l'irradiation est faite dans un milieu protecteur (protéines du liquide allantoïque, ou substances radioprotectrices).

III.2.4. - Effets sur les substances secrétées par les bactéries

Les travaux sur ce sujet sont assez peu nombreux ; ce sont les toxines staphylococciques et surtout les toxines botuliniques qui ont été étudiées.

III.2.4.1. - Substances fabriquées par Staphylococcus aureus

L'inactivation par irradiation de la coagulase a été étudiée par Kiortis (199). Une culture de 18 h d'une souche de S. aureus est irradiée à différentes doses. Après irradiation le nombre de survivants et le titre de coagulase sont mesurés. La coagulase est inactivée selon une courbe exponentielle, mais la pente est beaucoup plus faible que celle de la courbe de survie des germes. Les D 10 sont en effet respectivement de 98 et de 25 Krads. Des doses d'irradiation moyennes inhibent donc la multiplication des staphylocoques alors que l'activité coagulante n'est que modérément affectée. Il semble que les cellules bactériennes, devenues incapables de se multiplier, puissent produire encore de la coagulase. Cependant, les faits expérimentaux sur lesquels se basent les auteurs, pour l'affirmer ne sont pas totalement convaincants.

Erdman et Coll. (124) ont irradié de l' α toxine staphylococcique non purifiée. Le titre qui était avant irradiation de 1/8192 est réduit à 1/1024 avec une dose de 110 Kreps et à 1/256 avec une dose de 2,2 Mreps. L' α toxine paraît donc assez résistante à l'irradiation, elle est en tout cas beaucoup plus résistante que le pouvoir de multiplication du germe.

Des travaux de Read et Bradshaw (276) sur l'inactivation par irradiation gamma de l'enterotoxine staphylococcique B montre que celle-ci est également très résistante. Lorsque l'irradiation a lieu dans du tampon veronal la D 10 est de 2,7 Mrads, par contre dans du lait, la D 10 est de 9,7 Mrads.

III.2.4.2. - Toxines botuliniques

Wagenaar et Coll. (345 - 346) ont évalué la D 10 d'une toxine type A purifiée, irradiée dans différents milieux : en tampon , elle est de 0,2 Mrad, mais elle atteint 4 et 6 Mrads lorsque l'irradiation a lieu dans du lait ou du fromage.

Les travaux d'Anellis et Coll. (17 - 19) sur la radiorésistance des spores et des toxines de 10 souches de Clostridium botulinum (5 de type A et 5 de type B), inoculées dans des denrées alimentaires, donnent les résultats suivants. Dans du jambon cuit, les D 10 des 5 toxines de type A varient de 0,143 à 0,243 Mrad. Les D 10 des toxines B sont plus faibles, puisqu'elles sont comprises entre 0,061 et 0,194 Mrad. Lorsque l'irradiation est faite dans de la viande de porc, les D 10 varient de 0,27 à 0,34 Mrad pour le type A et de 0,11 à 0,33 pour le type B.

Skulberg (302) a étudié les variations de la radiosensibilité de toxines botuliniques de différents types, selon le milieu d'irradiation, la température et le pH.

L'inactivation est toujours exponentielle.

La toxine du type A irradiée dans du tampon à + 15° a une D 10 de 1,75 Mrad lorsque le pH est compris entre 3,8 et 4,8 et de 3,1 Mrad à pH 6,2.

La toxine B dans les mêmes conditions a des D 10 respectivement de 1,20 et 0,62. Lorsque l'irradiation a lieu à basse température (- 75° C) la D 10 à pH 6,2 est alors de 3 Mrads.

La toxine E irradiée en milieu de Robertson a une D 10 de 2,1 Mrads.

Dans l'ensemble, la dose inactivante pour les différentes toxines est beaucoup plus forte dans du bouillon que dans du tampon.

L'auteur conclut que les toxines botuliniques sont souvent plus résistantes que les spores, une dose de 4,5 Mrads qui inactive complètement celles-ci ne détruit pas toujours les toxines préformées.

Sakaguchi (287) lors d'une étude sur les toxines de type E, montre que des préparations purifiées irradiées en milieu aqueux sont très sensibles. Les protéines, certains acides aminés ont un pouvoir protecteur. Selon le milieu d'irradiation les D 10 varient de 0,04 Mrad à 2,1 Mrads.

III.3. - Effets mutagènes des radiations ionisantes

L'apparition de mutations chez des organismes exposés à des doses infraléthales de rayonnement ultra violet est bien connue. Witkin (351 - 352) a montré que l'irradiation UV entraînait une augmentation de la fréquence de mutants résistants, l'irradiation étant non seulement un agent sélectif, mais aussi un agent inducteur.

Les rayonnements ionisants peuvent-ils également créer des mutations : augmentation de la résistance, de la pathogénéicité, modifications des caractères biochimiques, sérologiques, etc ?

Ce sujet a attiré l'attention d'un certain nombre d'auteurs : en effet, de même que l'apparition de mutants résistants à la chaleur pose des problèmes pour la préparation de conserves alimentaires, que l'existence de bactéries résistantes aux antibiotiques entraîne beaucoup de difficultés dans le traitement des infections, l'apparition de mutants après irradiations par les rayons ionisants pourrait limiter l'emploi de la radiostérilisation.

III.3.1. - Effets sur la radiorésistance

Koh, Morehouse et Chandler (204) n'ont mis en évidence aucune augmentation de la radiorésistance des survivants d'E. coli après 2 irradiations par les rayons β .

Gaden et Henley (137) par contre obtiennent, après des expositions répétées aux rayons γ , une diminution de résistance pour la souche E. coli 15 et une augmentation pour les souches E. coli B et E. coli B/r. L'augmentation de résistance atteint un plateau après 20 cycles d'irradiations - cultures des survivants.

Erdman, Thatcher et MacQueen (125) ont soumis à des irradiations répétées des cultures d'E. coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Clostridium botulinum type A (formes végétatives et spores). Après 20 h d'incubation en bouillon, les cultures sont irradiées avec des doses calculées pour donner 99 % de mortalité. Immédiatement après irradiation, les survivants sont repiqués dans du bouillon frais, et à nouveau irradiés après 20 h d'incubation. Les cycles irradiation - culture sont répétés jusqu'au niveau désiré. La radiorésistance est appréciée, à l'aide de courbes de survie, pour les cultures irradiées et les cultures "parents" repiquées dans les mêmes conditions. E. coli soumis à des irradiations répétées de 150 Kreps montre une augmentation de la résistance atteignant un maximum après 12 cycles (la D 10 qui est de 20 Kreps au départ atteint 33 Kreps en 6 cycles et 40 Kreps après 12 cycles ; la D 10 se maintient à 40 Kreps au 18e cycle).

Les mutants obtenus paraissent stables puisque aucune modification de la radiorésistance ne survient après 8 mois de conservation.

Trois souches de Staphylococcus aureus ont été traitées avec des irradiations de 200 Kreps. Deux d'entre elles n'ont acquis aucune augmentation de radiorésistance après 14 cycles, alors que la 3ème a vu sa radiorésistance augmenter légèrement avec le même traitement (la D 10 passe de 50 Kreps à environ 62 Kreps).

L'augmentation de radiorésistance apparaît rapidement avec Streptococcus faecalis et atteint un maximum en 6 cycles d'irradiation à 200 Kreps. La D 10 qui était de 40 Kreps à l'origine atteint alors 66 Kreps.

La résistance des formes végétatives de Clostridium botulinum type A est augmentée d'un facteur 1,3 après 10 irradiations à 200 Kreps. Les spores formées à partir de la culture ainsi sélectionnée montrent une très légère augmentation de résistance par rapport à celle des spores originelles, (en fait, les pentes des 2 courbes de survie sont pratiquement identiques, mais la courbe obtenue après irradiation répétée est légèrement déplacée vers la droite).

Enfin, la radiorésistance de S. gallinarum n'est pas modifiée après 14 cycles consécutifs de 200 Kreps.

Les spores de Bacillus pumilus E 95 et Clostridium sporogenes ayant survécu à une ou deux irradiations avec une dose infraléthale maximum n'ont pas acquis une augmentation de radiorésistance (Pepper et Coll. 250)

Licciardello et Coll. (217) ont étudié l'augmentation de la radiorésistance de souches de Salmonella (S. typhimurium ATCC 7823, Salmonella newport ATCC 6962, Salmonella thompson ATCC 8391, Salmonella heidelberg ATCC 8326), soumises à des irradiations répétées d'une part avec une dose faible (dose qui réduit la population par un facteur de 10^2) et d'autre part avec une dose plus forte (dose abaissant la population bactérienne d'un facteur 10^5 ou 10^6).

Dans tous les cas, une augmentation de résistance a été obtenue, mais celle-ci apparaît plus rapidement et atteint un niveau plus élevé avec la dose la plus faible.

Les mutants radiorésistants de S. newport et S. typhimurium sélectionnés au 20ème cycle sont stables (pas de modification après 24 repiquages). Les auteurs, en utilisant la technique de fluctuation de Luria et Delbruck (222) n'ont pu préciser si l'irradiation agit comme agent sélectif ou comme agent mutagène.

La fréquence de cellules radiorésistantes dans une population de S. newport est de 1 pour 8,9 millions et de 1 pour 19 millions pour S. typhimurium.

Après 20 cycles d'irradiation, la D 10 pour S. newport passe de 12,5 à 15 Krads, mais il faut noter que l'allure de la courbe de survie est nettement modifiée.

Alors qu'au départ, il existe un très léger épaulement de 7,5 Krads, après 20 cycles d'irradiations répétées l'épaulement est très accentué (32,5 Kds).

Previtte et Coll. (269) par contre n'ont obtenu aucune augmentation de la radiorésistance de 2 souches de Salmonella typhimurium après 10 cycles d'irradiation à 0,5 Mrad, dans de la viande de poulet (les D 10 de ces souches sont de 50 et 60 Krads, la dose d'irradiation de 0,5 Mrad aboutissait donc à une diminution de la population d'un facteur 10^6 et 10^8 environ).

Corry et Coll. (88) obtiennent une augmentation de la radiorésistance (D 10 multipliée par 2) d'une souche sur les 3 souches de S. typhimurium soumises à des cycles irradiation-subcultures (la dose utilisée réduisait la population d'un facteur 10^3).

Il est donc possible d'augmenter la radiorésistance de certaines souches bactériennes avec des irradiations répétées. Il ressort de l'ensemble de ces travaux que la probabilité d'augmenter la résistance est plus grande lorsque les doses d'irradiation utilisées sont faibles et lorsque le nombre de cycles atteint un certain niveau.

III.3.2. - Effets sur les caractères morphologiques, cultureux et biochimiques.

Certains auteurs cités précédemment ont également étudié l'influence d'irradiations répétées sur ces différents caractères bactériens. Ainsi, Erdman et Coll. (125) notent que si les souches de S. aureus demeurent toutes mannitol et coagulase positives, deux d'entre elles donnent une large proportion de colonies ayant perdu leur pigment. D'autre part, des modifications de la sensibilité aux phages sont observées. Pour l'une de ces souches qui était sensible aux phages 80 et 81, après 14 cycles d'irradiation, l'image lysotypique est la suivante : 52/52 A/80/81.

S. faecalis semble peu touché : aucune modification de l'aspect des colonies, de la tolérance à l'azide de Na, à 6,5 % de NaCl et à pH9,6 n'est détectée.

E. coli irradié ne montre aucune modification du rouge de méthyl, du Vosge-Proskauer et du citrate, par contre après 12 cycles toutes les cultures sont indole négatives. Des modifications de l'aspect des colonies sur milieu Eosine-bleu de méthylène sont également notées.

La production de toxine par Cl. botulinum type A reste identique alors que Cl. botulinum type E devient rapidement non toxigène.

Licciardello et Coll. (217 - 218) notent une modification de la morphologie des 4 souches de *Salmonella* étudiées, les cellules des cultures résistantes étant plus grosses avec une forme coccoïde ; cet aspect étant particulièrement net pour S. newport, (il est possible que ces cellules soient polyploïdes, ce qui expliquerait l'existence d'un épaulement important).

Il apparaît également quelques changements dans les caractères biochimiques (50 cultures résistantes de S. newport, 7 de S. thompson n'utilisent plus le citrate, 2 cultures de cette dernière espèce ne produisent plus d'hydrogène sulfuré).

Aucune modification de l'aspect des colonies sur différents milieux sélectifs n'est notée.

Enfin Corry et Coll. (88) n'ont pas observé de modification des caractères biochimiques des *Salmonella* étudiées. Par contre, les colonies après irradiation sont très souvent rugueuses (voir paragraphe III.2.3.1.)

III.3.3. - Effet sur la virulence

La virulence des *Salmonella* soumises à des irradiations répétées demeure inchangée ou est parfois faiblement réduite (218 - 272).

III.3.4. - Résistance aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques des 4 souches de Salmonella étudiées a été testée par Licciardello et Coll. (218) après irradiations répétées. La méthode utilisée est la technique classique de l'antibiogramme. La sensibilité vis à vis de 3 antibiotiques (Chloramphénicol, Tétracycline et Ampicilline) n'est pas significativement modifiée pour les souches devenues radiorésistantes.

Previtte et Coll. (269) ont trouvé également que les populations de Salmonella typhimurium survivant à 1, 5 ou 10 expositions à 0,5 Mrad ne montrent aucune augmentation de la résistance, à la Tétracycline, au Chloramphénicol, à la Polymyxine et à la Streptomycine. Previtte et Coll. (270) dans un autre travail ont comparé la fréquence d'apparition de mutants résistants à la Tétracycline (3 mcg) et à la Streptomycine (3 mcg) dans des cultures de Salmonella typhimurium (souche SR 11 et R1A), S. thompson et S. heidelberg irradiées avec une seule dose (dose comprise entre 0,05 et 0,5 Mrad), par rapport à des cultures témoins non irradiées.

Les résultats obtenus sont les suivants : (voir tableau et figure n° 4)

Dose en Mrad	Fréquence de mutation x 10 ⁻⁷
0	2,9
0,05	31,1
0,10	9,3
0,30	2,8
0,50	2,3

Fréquence de mutation de la résistance à 3 mcg
de Tétracycline pour la souche de S. typhimurium R1A

On constate donc que la fréquence de mutation de résistance à la Tétracycline de la souche S. typhimurium augmente entre 0 et 0,05 Mrad. Pour des doses supérieures, la fréquence diminue et revient à peu près au taux de départ après irradiation à 0,5 Mrad.

En ce qui concerne la résistance à la Streptomycine, on note une augmentation de la fréquence de mutation en fonction de la dose pour S. thompson, heidelberg et typhimurium R1A.

S. typhimurium SR donne des résultats un peu différents puisque la fréquence augmente à 0,05 Mrad, diminue ensuite jusqu'à 0,2 et augmente à nouveau à 0,3 Mrad.

L'irradiation augmente donc la fréquence de mutation de la résistance à la Streptomycine. Les auteurs ont voulu voir s'il y avait parallèlement une augmentation en valeur absolue du nombre des mutants : cette augmentation est très faible et est toujours inférieure à 1 log.

En conclusion, il apparaît que des mutations peuvent être mises en évidence après exposition aux rayonnements ionisants, mais actuellement on n'ignore si l'irradiation agit comme élément sélectionnant ou comme agent inducteur. Dans la plupart des cas, les mutants sont mis en évidence lorsque les irradiations sont répétées un certain nombre de fois et lorsque les doses sont faibles (doses très inférieures aux doses habituellement utilisées pour la radiostérilisation, comme nous le verrons par la suite).

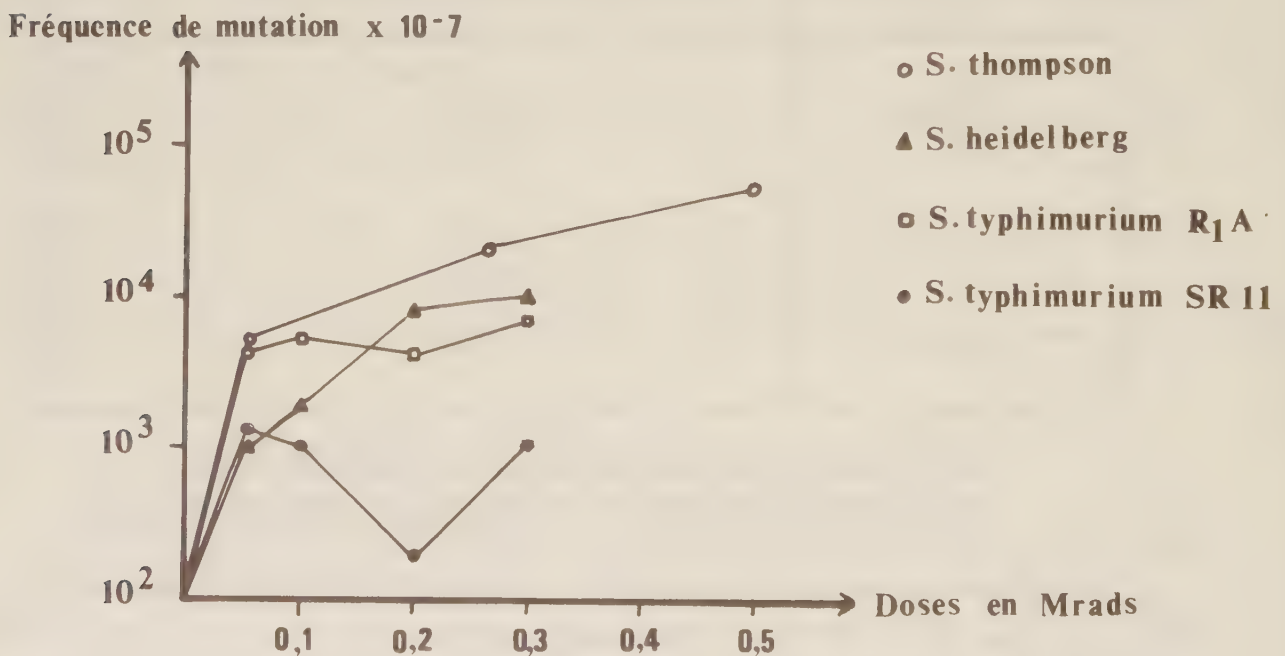


Figure 4 : FREQUENCE DE RESISTANCE A 30 μ g DE STREPTOMYCINE APRES IRRADIATIONS REPETEES DE 4 SOUCHES DE SALMONELLA

D'après PREVITTE et Coll. (270)

IV - FACTEURS MODIFIANT LA RADIOSENSIBILITE

IV. FACTEURS MODIFIANT LA RADIOSENSIBILITE

Il existe de très nombreux facteurs modifiant la radiosensibilité des microorganismes. Pour faciliter la clarté de l'exposé, ces facteurs seront classés dans différentes catégories séparées, mais il ne faut pas oublier qu'ils peuvent s'influencer l'un l'autre.

Schématiquement, on peut classer ces facteurs en trois catégories :

- les facteurs intervenant avant irradiation,
- les facteurs intervenant pendant l'irradiation,
- les facteurs intervenant après irradiation.

IV.1. - Facteurs intervenant avant irradiation

Ils concernent les conditions de culture avant irradiation et sont essentiellement au nombre de trois.

IV.1.1. - Age de la culture

En 1955 Stapleton (306) a étudié les variations de sensibilité aux rayons X d'E. coli pendant les différentes phases de la croissance. La figure n° 5 (page 51) montre les résultats obtenus.

La radiorésistance augmente pendant la phase de latence atteignant un maximum juste avant le début de la phase exponentielle. Pendant cette dernière phase une diminution rapide de la résistance se produit et celle-ci atteint un minimum à la fin de la croissance exponentielle. Lors de la phase stationnaire, il y a, à nouveau, augmentation de la résistance.

Par ailleurs, il faut signaler que les courbes de survie obtenues pendant la phase de latence sont sigmoïdes ; les pentes sont identiques, seule l'importance de l'épaule change en fonction du temps. Or, on sait que pendant cette phase, les cellules sont multinucléées. Une sensibilité maximale pendant la phase logarithmique a été également rapportée par Spoerl et Coll. (304).

Fraction survivante à 30 KR

Nombre de germes

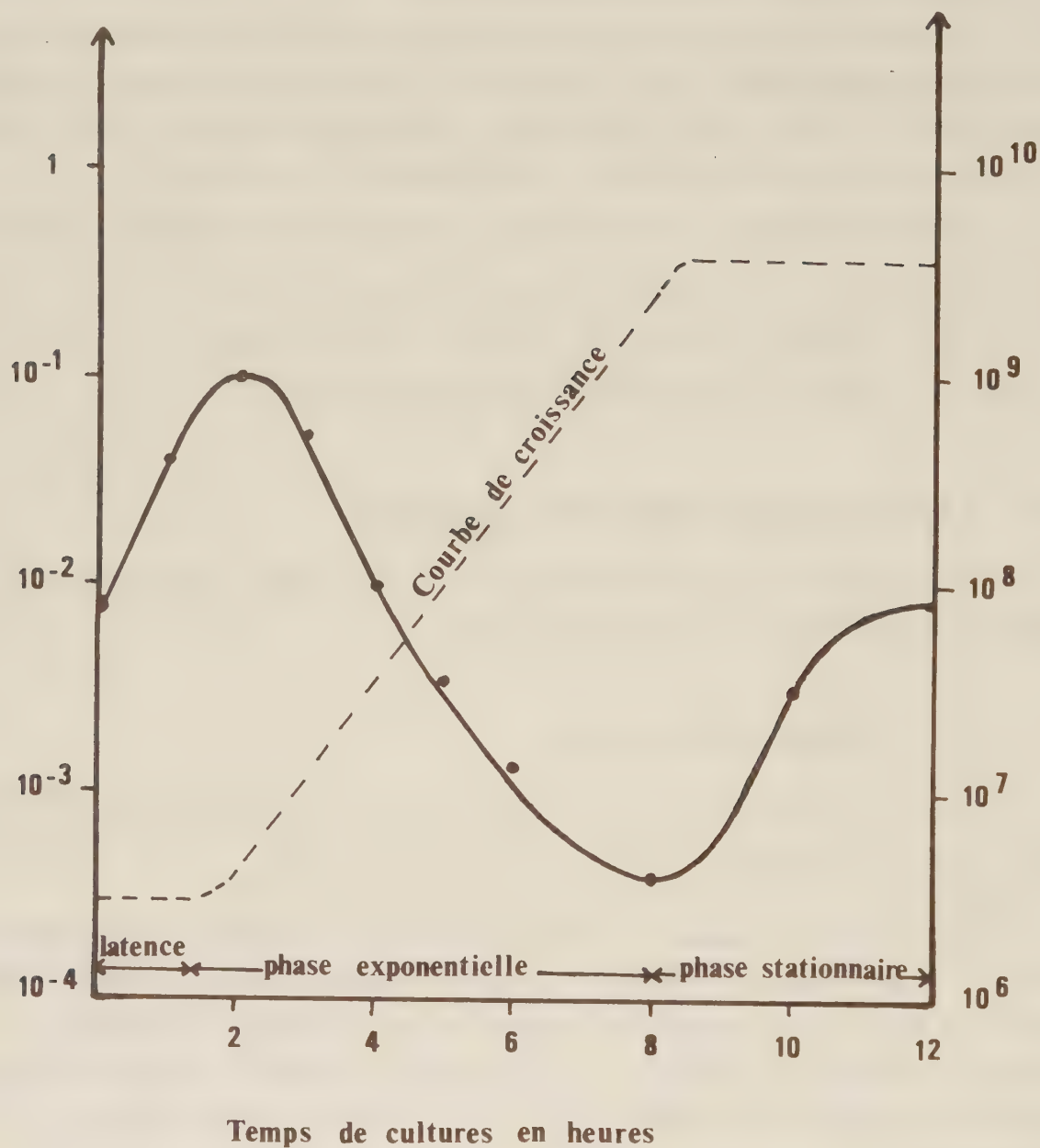


Figure 5 : VARIATION DE LA RADIOSENSIBILITE D'E.COLI
PENDANT LE CYCLE DE CROISSANCE

D'après STAPLETON (306)

IV.1.2. - Nombre d'organismes

En général, la radiosensibilité est indépendante du nombre initial de cellules. Cependant, une diminution de la sensibilité est observée dans des suspensions bactériennes contenant plus de 10^{11} cellules par ml et en équilibre avec l'air (Stapleton, 306). Cet effet est complètement supprimé par saturation en oxygène de la suspension avant irradiation. Cette augmentation de la résistance peut être expliquée par la diminution en oxygène dissous due à la respiration endogène (nous verrons plus loin que la teneur en oxygène est un facteur important pour la radiosensibilité).

IV.1.3. - Milieu de culture

Peu de travaux portent sur ce sujet.

Différents auteurs (192 - 315) ont montré que des bactéries cultivées sur des milieux contenant des bases puriques ou pyrimidiques halogénées voient leur radiosensibilité augmentée.

Freedman et Bruce (130) ont cultivé Micrococcus radiodurans sur des milieux de culture qui donnaient une vitesse de croissance différente aboutissant à des changements dans la composition macromoléculaire. Ils ont observé alors, que la sensibilité aux rayons X augmente quand la vitesse de croissance augmente.

IV.2. - Facteurs intervenant pendant l'irradiation

IV.2.1. - Type de radiation

Il existe des différences entre les effets radiobiologiques de radiations ayant des LET ou transfert linéaire d'énergie différents, (13 - 42 - 53 - 267).

Mais, comme le remarque Bridges (53), si cela présente beaucoup d'intérêt en radiobiologie fondamentale, pour la radiostérilisation, l'intérêt est assez faible puisque seuls les rayons X, les rayons γ et les flux d'électrons sont utilisables. Lorsque les conditions sont comparables (énergie des radiations, débit de dose, uniformité de la dose reçue), l'effet bactéricide semble être le même pour ces trois types de radiations (53).

Cependant, Emborg, Christensen et Kallings (122) ont trouvé que les rayons γ du Cobalt 60 ont un effet inactivateur plus élevé que les flux d'électrons sur les témoins microbiologiques de Streptococcus faecium A21 et Coli phage T1.

IV.2.2. - Débit de dose

Les différents types d'irradiateurs utilisés pour la radiostérilisation ont des débits de doses différents ; en effet, il faut plusieurs heures pour avoir une dose stérilisante avec les rayons γ , par contre, la même dose est obtenue en quelques minutes, voire quelques secondes, avec les accélérateurs d'électrons.

Dans certains cas (53) aucune différence entre différents débits de dose n'a été mise en évidence. Powers (267) cependant a trouvé que de forts débits de dose de rayons X sont plus efficaces que de faibles débits.

IV.2.3. - Teneur en oxygène

En 1951 Hollaender, Stapleton et Martin (164) ont montré pour la première fois que les bactéries sont 3 fois plus sensibles lorsqu'elles sont irradiées en présence d'O₂ qu'en présence d'azote.

Alper et Howard-Flanders (9), Howard-Flanders et Alper (172) ont comparé la radiosensibilité de différentes bactéries dans différentes atmosphères gazeuses. En présence d'oxygène la forme des courbes de survie reste la même, par contre la pente est augmentée (les bactéries sont donc plus sensibles).

L'effet oxygène peut être exprimé par le facteur de modification de la dose (ou dmf : dose modifying factor en anglais). C'est le rapport de la pente de la courbe sous oxygène sur la pente en présence d'azote. L'oxygène est actif à toutes les concentrations ; des teneurs en oxygène aussi faibles que 4 à 7 micromoles par litre donnent la moitié de l'effet oxygène. L'oxygène doit être présent pendant l'irradiation pour être efficace.

Goldblith et Coll. (145) ont mis également en évidence un effet oxygène sur différentes bactéries végétatives.

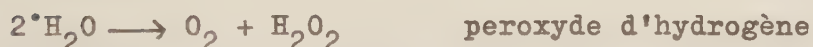
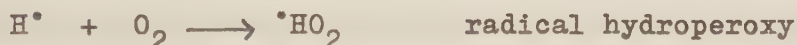
Fuld, Proctor et Goldblith (136) constatent que la sensibilité de E. coli, de spores de Bacillus subtilis et de Clostridium sporogenes est augmentée en présence d'oxygène ; par contre les spores de Bacillus thermoacidurans ne montrent pas de différence de sensibilité quand elles sont irradiées dans l'oxygène, l'air, l'azote ou le vide.

Webb et Powers (348) obtiennent un dmf de 2 pour des spores de Bacillus megaterium irradiées dans l'eau. Lorsque les spores sont deséchées le dmf immédiat est de 1,25 et l'effet latent de 1,9. D'après Bridges (53 - 49) le dmf est d'environ 3 pour les bactéries végétatives, par contre pour les spores, il ne dépasse jamais 2.

Quels sont les mécanismes pouvant expliquer l'effet sensibilisant de l'oxygène ?

Dès 1955, Hannan (158) pense que l'action de l'oxygène peut être expliquée dans le cadre de l'action indirecte :

L'oxygène dissous augmente le nombre de radicaux libres $\text{OH}^\bullet$ et $\text{HO}_2^\bullet$ et la concentration en peroxydes. En effet, les différents travaux sur la radiolyse de l'eau (30e - 299) ont montré que les radicaux $\text{OH}^\bullet$ et $\text{H}^\bullet$ formés réagissaient avec l'oxygène de la façon suivante :

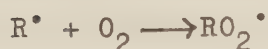
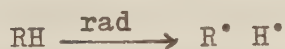


Donc, en formant $\text{}^\bullet\text{HO}_2$ l'oxygène s'oppose à la recombinaison des radicaux $\text{H}^\bullet$ et $\text{OH}^\bullet$ ($\text{H}^\bullet + \text{OH}^\bullet \longrightarrow \text{H}_2\text{O}$), et augmente ainsi la concentration en $\text{OH}^\bullet$ disponibles. D'autre part, il permet la formation de peroxyde d'hydrogène en quantité relativement importante.

Le fait que les spores bactériennes dont la teneur en eau est faible soient moins sensibles à l'effet oxygène est donc en faveur de cette théorie.

Cependant, Alper (10) a discuté les mécanismes possibles et a proposé un mécanisme basé uniquement sur l'action directe : les radicaux libres formés à partir des molécules cibles réagiraient avec l'oxygène pour donner des formes non restaurables.

Par la suite, il a été montré (30e) que l'oxygène intervenait bien dans l'action directe et des réactions en chaîne se produisent :



En fait, les deux théories ne sont pas contradictoires et les deux mécanismes coexistent (30e).

Nous avons vu que l'oxygène est actif lorsqu'il est présent pendant l'irradiation. Cependant, Powers (267) a montré que l'oxygène pouvait agir de deux façons sur les spores bactériennes :

- effet mis en évidence uniquement lorsque l'oxygène est présent pendant l'irradiation,
- effet observé lorsque l'oxygène est ajouté après irradiation en anoxie. En effet, si on remplace après irradiation, l'oxygène par de l'oxyde nitrique No, les spores deviennent plus résistantes.

L'effet oxygène après irradiation serait dû à la combinaison de l'oxygène avec les radicaux libres persistants après irradiation. No serait capable d'éliminer les radicaux libres présents dans la cellule.

D'après Powers, l'action des radiations ionisantes sur les spores se ferait selon 3 mécanismes :

- 1 mécanisme indépendant de l'oxygène : radiolésion de type I,
- 1 mécanisme dépendant de la présence de l'oxygène pendant l'irradiation : radiolésion de type II,
- 1 mécanisme dépendant de la présence de l'oxygène après irradiation : radiolésion de type III.

Lorsque les spores sont irradiées et cultivées en présence d'oxygène, les 3 effets s'ajoutent.

En conclusion, en raison de son importance l'effet oxygène doit être considéré dans toute discussion sur la radiosensibilité des microorganismes.

Nous verrons dans le prochain chapitre les variations des radiosensibilités en fonction de la composition de l'atmosphère.

IV.2.4. - Degré d'hydratation

Nous avons vu l'importance de l'action indirecte avec le rôle joué par les radicaux libres libérés par radiolyse de l'eau (intra ou extra cellulaire). Il n'est donc pas étonnant que la teneur en eau des cellules influence les résultats et que la deshydratation augmente la radiorésistance (à ce moment, seule l'action directe persiste).

Moos (233), Bellamy et Lawton (35) ont montré très tôt que la radiorésistance des bactéries végétatives augmentait lorsque l'irradiation était faite à l'état sec.

Battacharjee (34) a confirmé par la suite les résultats avec E.coli. Dans des conditions de deshydratation contrôlées, la Do de la souche qui était de 3,6 Krads en atmosphère humide passe à 6 Krads après une dessiccation de 1 h 30 et atteint 12,4 Krads après 24 à 48 heures de dessiccation.

Ahn et Coll. (4) ont étudié la radiorésistance de Staphylococcus aureus irradié en suspension et après lyophilisation : la D 10 passe de 40 Krads à 140 Krads.

Christensen et Sehested (69) ont montré que Streptococcus faecium est considérablement plus résistant lorsqu'il est irradié à l'état sec.

D'autres travaux ont été effectués sur les bactéries végétatives, et dans tous les cas la deshydratation augmente la résistance.

Pour les spores, les résultats sont contradictoires. Pepper et Coll. (250), Burt et Ley (62) n'ont obtenu aucune modification de la radiorésistance lorsque des spores de Bacillus sont irradiées à l'état sec. Borick et Fogarty (46) trouvent même que les spores de Bacillus pumilus et Clostridium tetani sont plus sensibles lorsqu'elles

sont desséchées. Tallentire et Power (316) dans une étude sur les spores de B. megaterium ont montré qu'en aérobiose la radiorésistance diminue de 2 à 3 fois lorsque la teneur en eau passe de 30 % V/V à 0,3 %. Par contre, en anaérobiose, la résistance augmente de 25 % lorsque la teneur en eau diminue.

Nous avons vu que Powers (267) décrivait 3 types de radiolésions chez les spores : les radiolésions de type I sont peu modifiées par la teneur en eau, alors que les deux autres types dépendent de la teneur en eau et dans les deux cas, l'eau agit comme agent protecteur chez les spores.

On voit donc que la teneur en eau joue un rôle important et que la dessiccation augmente en général la radiorésistance. Par contre, pour les spores l'effet serait dans certains cas inverse.

IV.2.5. - Influence de la température

C'est également un facteur important de modification de la radiosensibilité. En effet, l'abaissement de la température empêche la migration des radicaux libres et diminue donc les effets de l'action indirecte.

Dès 1953, Stapleton et Edington (305) ont montré que l'abaissement de la température diminuait la radiosensibilité d'E. coli. Le changement de radiosensibilité est brusque et survient à quelques degrés en dessous de 0° C. Dans un autre travail (308), les auteurs ont montré qu'en dessous de 0° C, à la fois la température et la teneur en oxygène contribuent au changement de sensibilité. Au dessus de 0° et jusqu'à 40°, les changements de température n'affectent pas la radiosensibilité.

Par la suite, d'autres auteurs ont confirmé que la radiosensibilité des bactéries végétatives était diminuée aux basses températures (35 - 125 - 136 - 145).

Licciardello (216) contrairement à Stapleton et Edington observe une augmentation de la radiosensibilité de Salmonella typhimurium lorsque la température augmente de 0° à + 55° C.

En 1965, Matsuyama et Coll. (231) ont étudié les variations de radiosensibilité de 5 souches bactériennes irradiées en aérobiose ou

anaérobiose à + 10-13° et - 79° C. La diminution de radiosensibilité a été mesurée par le rapport des D10 obtenues (D10 à - 79° C / D10 à + 10-13° C).

Le rapport est compris entre 2,5 et 8,5. Pour la souche d'Alcaligenes, il est d'environ 4. Pour le Pseudomonas étudié, le rapport le plus élevé (8,5) est obtenu en anoxie, il est 1,5 fois plus élevé qu'en aérobiose.

Pour les souches de Streptococcus faecium en aérobiose le rapport est de 3 à 4. Mais il faut noter que si les courbes obtenues sont toujours sigmoïdes, l'importance de l'épaulement varie selon les conditions d'irradiation.

Enfin, pour E. coli B/r, une augmentation de la D10 est également observée. Mais les résultats sont difficilement comparables car la forme de la courbe change : elle est exponentielle à 10-13° C en aérobiose, alors qu'à 10-13° en anaérobiose et à - 79° C, elle est composite (double exponentielle).

Plus récemment, Anellis et Coll. (20) ont étudié la radiosensibilité à différentes températures de la souche de Streptococcus faecium A₂¹. A toutes les températures testées (+ 5°, - 30°, - 80°, - 140°, -196° C) les courbes obtenues sont composites et correspondent à deux exponentielles de pentes différentes. Les D10 calculées sur les 2 parties de la courbe augmentent toujours lorsque la température diminue.

L'influence de la température sur la radiosensibilité des spores est variable. Pepper et Coll. (250) ont trouvé que les spores de Bacillus pumilus sont plus sensibles quand elles sont irradiées à basse température. Ceci a été confirmé par Fuld et Coll. (136) pour Bacillus subtilis, mais pas pour Bacillus thermoacidurans et Clostridium sporogenes : leurs sensibilités ne sont pas modifiées.

Par contre, Denny et Coll. (102) observent une augmentation de la résistance de Clostridium botulinum type A et B irradié à - 20° C par rapport à l'irradiation à la température ambiante.

Grecz et Coll. (153) ont comparé la radiorésistance de Clostridium botulinum type A irradié à 0° et - 196° C. En tampon, les D10 sont de 0,290 Mrad à 0° et 0,396 Mrad à - 196° C. Dans la viande hachée, elles sont de 0,463 Mrad et 0,680 Mrad respectivement.

Pour Matsuyama et Coll. (232) les spores de Bacillus pumilus monrent la même sensibilité lorsqu'elles sont irradiées en aérobiose à 10-13° C ou - 79° C dans du tampon phosphate ou en bouillon. Il en est de même pour les spores de Clostridium welchii.

Enfin, quelques travaux ont été faits sur les virus. Ghys et Coll. (140) ont irradié une souche de Myxovirus influenzae A₂ et une souche de type B, à + 20° et à - 78° C. Dans les deux cas l'inactivation est moins importante à basse température. L'allure de la courbe se modifie également, d'exponentielle elle devient composite.

Sullivan et Coll. (313) ont irradié du Cocksackievirus B2 dans différents milieux et à différentes températures (+ 0,5° C, - 30° C, - 60° C, - 90° C). Les D10 sont très peu modifiées lorsque le virus est irradié dans des milieux contenant des protéines. Par contre, lorsque le virus est irradié en suspension dans de l'eau distillée, la D10 qui est de 0,14 Mrad à + 0,5° C passe à 0,53 Mrad à -90° C.

IV.2.6. - Influence du pH

Elle est dans l'ensemble assez peu connue.

Fuld et Coll. (136) n'ont observé aucune modification de la radio-résistance de Bacillus subtilis irradié à différents pH.

Par contre, pour Clostridium sporogenes et Bacillus thermoacidurans la résistance varie en fonction du pH. Elle est maximum à pH 7, est également élevée à pH 4,6 et plus faible à pH 2 et 10.

Bridges et Horne (49) ont fait une revue de la littérature jusqu'en 1959. A pH 7 la résistance de Staphylococcus aureus est augmentée, par contre aucun effet du pH n'a été mis en évidence pour Pseudomonas geniculata et Bacillus subtilis.

En 1969, Upadhyay et Grecz (341) ont étudié les effets du pH sur les spores de Clostridium botulinum 33A. Lorsque l'irradiation est faite à - 190° C, la résistance est maximum à pH 7 et 9,5 et minimum à pH 8 et 10-11. A - 50° C, le maximum est obtenu à pH 8,5 et le minimum à pH 7 et 10. A 0° C, les pH 7,5 et 10 donnent le plus grand nombre de survivants alors que les pH 6, 9, 11 donnent un minimum.

Les résultats pourraient être expliqués dans le cadre des effets indirects. Les pH donnant le moins de survivants permettraient d'avoir un maximum d'activité des radicaux $\text{OH}^\bullet$ et à l'inverse le maximum de survie correspondrait à une diminution des radicaux $\text{OH}^\bullet$ par réaction avec les radicaux $\text{H}^\bullet$ et les électrons aqueux e^-_{aq} .

IV.2.7. - Influence du milieu d'irradiation

IV.2.7.1. - Substances protectrices

La composition du milieu d'irradiation joue un rôle très important. Nous avons vu le rôle des effets indirects et de la teneur en oxygène dans l'inactivation par les rayons ionisants. Il est donc certain que toute substance capable de réagir avec les radicaux libres ou capable de fixer l'oxygène dissous pourra réduire l'effet léthal des radiations. C'est le cas, entre autres, des acides aminés, des protéines, des hydrates de carbone.

Ainsi les microorganismes n'ont pas la même radiosensibilité s'ils sont irradiés dans de l'eau ou du tampon et dans un milieu contenant des acides aminés (bouillon nutritif), des protéines ou des substances organiques.

Il n'est pas possible de décrire ici en détail, l'effet protecteur de tel ou tel milieu car l'énumération en serait fastidieuse. Nous verrons dans le prochain chapitre comment les radiosensibilités varient en fonction du milieu d'irradiation et il faut bien garder à l'esprit qu'aucune comparaison ne peut être faite si la nature du milieu d'irradiation n'est pas connue.

Nous allons voir maintenant quels sont les principaux produits chimiques connus pour avoir un effet radioprotecteur.

* Agents réducteurs *****

Un des meilleurs est le thiosulfate de sodium qui apporte un effet protecteur significatif à des concentrations aussi basses que 0,0001 M (Hollaender et Stapleton, 1965). Il agirait par sa capacité de fixer l'oxygène dissous.

* Composés sulfhydriques

Un grand nombre de composés thiols exercent un effet protecteur. Les plus importants sont la cystéine, le glutathion, la mercaptoethanolamine (ou cysteamine), la thiourée.

Hollaender et Stapleton (165) notent pour E. coli un effet protecteur de la cystéine et de la mercaptoethanolamine avec des concentrations faibles de l'ordre de 0,0025 M. Le facteur de modification de dose est de 3 pour la cystéine et 4 pour la cysteamine.

Bridges (52) obtient des facteurs de modification de doses de 1,8 avec 0,1 M de cystéine et 2,1 avec de la thiourée 0,2 M, pour une souche de Pseudomonas sp irradié en anoxie.

Très tôt, il a été noté que les composés thiols agissent selon 2 mécanismes (52 - 53) :

- à faibles concentrations, ils agissent en diminuant le taux d'oxygène dissous par autooxydation, mais aussi par une réaction induite par l'irradiation

- à fortes concentrations, la protection n'est pas due à une consommation d'oxygène puisque la protection est observée lorsque l'irradiation a lieu en anoxie. Dans ce cas, les composés thiols doivent non seulement être présents pendant l'irradiation, mais aussi quelques temps avant l'irradiation.

Myers (240) a montré comment la cysteamine protégeait les ADN et empêchait les ruptures des chaînes dues à la rupture de la liaison sucre phosphate résultant de l'attaque par les radicaux $\text{OH}^\bullet$. On peut schématiser la réaction de la façon suivante :

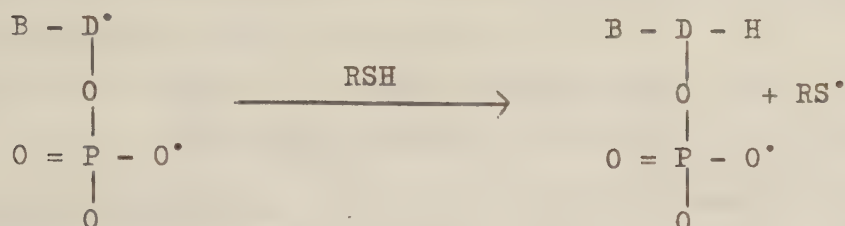


radical pentose

B = base

D = pentose

Si un composé sulfhydrique est présent la réaction suivante pourra se produire :



Il y a donc restauration de la "lésion".

Van Hemmen et Coll. (342) ont étudié l'effet protecteur de la cysteamine sur de l'ADN bactériophagique purifié (ADN bicaténaire du phage X 174). La formation des ruptures d'une seule chaîne est influencée par la cysteamine, ce qui aboutit à une réduction de leur nombre.

* Acides carboxyliques, acides aminés, glucose

Ils possèdent également un bon pouvoir protecteur (dmf de 2,5 à 3) comme l'ont montré Stapleton et Hollaender (165). Ils agissent par stimulation des activités métaboliques aboutissant à une consommation de l'oxygène. Les auteurs le démontrent avec l'exemple de l' α et la β alanine. Ce dernier n'a aucun effet protecteur car il n'est pas métabolisé.

Ces produits sont efficaces à faibles concentrations si les microorganismes ont été incubés en leur présence avant irradiation.

* Alcools aliphatiques

Les premiers Hollaender et Stapleton (165) ont mis en évidence le pouvoir protecteur du glycérol, du propylèneglycol et du triéthylèneglycol, ainsi que des alcools éthylique et propylique. Ceci a été confirmé par la suite. Dewey (104) obtient un effet protecteur du glycérol (dmf = 2) lors de l'irradiation de Serratia marcescens. Il a montré que l'effet protecteur est plus grand en aérobiose qu'en anaérobiose. Le produit doit être présent pendant l'irradiation à une concentration d'environ 10 %. En anoxie Bridges (52) obtient un dmf de 2 en irradiant un Pseudomonas sp avec du glycérol 2M.

Cramp (89) a étudié l'effet protecteur d'une série d'alcools aliphatiques sur Shigella flexneri. La facteur de réduction de dose de la glycérine est de 2,5 en aérobiose ; il est plus faible en anaérobiose.

Webb et Powers (348) ont également trouvé que le glycérol avait un effet protecteur pour les spores de B. megaterium (dmf = 2).

Comme l'avait démontré Dewey (105) avec Serratia marcescens, Pleceas et Coll. (255) observent un effet protecteur de l'éthylène glycol (1M) sur E. coli. Ils obtiennent un dmf de 2,5.

Les différents alcools testés par Cramp (89) sont l'alcool éthylique, l'ethanediol, l'érythritol, le 1-4 butanediol, le β mercaptoethanol. Tous ces composés sont protecteurs aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose. Le plus efficace est le β mercaptoethanol (mais il est toxique lorsque la concentration dépasse 0,4 M). En aérobiose à la concentration de 0,3 M, le dmf est de 3,5. L'alcool éthylique est le moins efficace, tandis que les 3 autres ont un pouvoir protecteur intermédiaire (identique à celui du glycérol). L'auteur pense que l'efficacité protectrice de ces différents alcools serait en relation avec leur capacité de fixer les radicaux OH^{*}.

Enfin, Redpath (277) a montré que le dithiothreitol avait un effet protecteur sur Serratia marcescens ; avec la concentration la plus forte (100 mM) le dmf est 2.

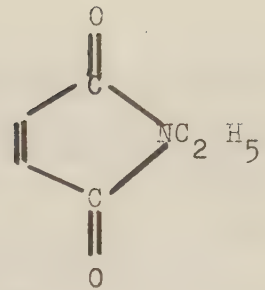
* Dimethylsulfoxyde (DMSO)

Bridges (52) a étudié l'effet protecteur du DMSO sur Pseudomonas sp irradié en anoxie, le facteur de modification de dose est de 1,6 pour une concentration du produit de 1 M.

IV.2.7.2. - Substances sensibilisantes

La possibilité d'utiliser des composés chimiques capables d'augmenter les effets lethaux des radiations ionisantes a fait l'objet d'un grand nombre de travaux. Un certain nombre de produits ont montré un effet sensibilisant, (bien entendu, ces substances n'ont pas d'effet bactéricide propre).

Bridges (50 - 51) a montré que la N ethylmaleimide était capable de sensibiliser certaines souches de microorganismes tels que E. coli B/r, Staphylococcus aureus, Pseudomonas sp. Cette substance est efficace à une concentration supérieure à 0,002 M et doit être présente pendant l'irradiation. L'effet est toujours plus faible en aérobiose (il est même absent pour Pseudomonas). Par contre, aucun effet n'est obtenu sur des spores de Bacillus subtilis.



Le mécanisme d'action suggéré par Bridges est que le composé se combine avec des radicaux R-S[•] et empêche donc la restauration de la molécule.

L'effet sensibilisant de la N ethylmaleimide (NEM) a été ensuite observé pour un grand nombre de bactéries.

En 1969, Mullenger et Ormerod (238) ont étudié l'effet de la NEM sur Micrococcus sodonensis. L'effet sensibilisant est plus marqué en anaérobiose (dmf 0,56 en anaérobiose, et 0,83 en aérobiose).

Les auteurs montrent que cette substance agit selon trois mécanismes :

- réaction intracellulaire avec les groupes sulphydriques
- réaction avec les e⁻ aqueux pour donner un radical libre toxique
- par interférence avec les processus de restauration se produisant normalement après l'irradiation.

Par la suite, il a été observé que d'autres substances ayant un ou plusieurs groupes carbonyle avaient également des propriétés sensibilisantes (148 - 90). C'est le cas de la ninhydrine (indanetrione), de l'isatine (2-3) indolenedione et de la menadione (2 methyl-1-4 naph-toquinone). Barnes et Coll. (31) rapportent en 1969 les effets sensibilisants sur Serratia marcescens d'une série de composés carbonylés (facteur de sensibilisation allant de 1,8 à 3,7).

D'autres substances réagissant avec les groupements thiols se sont révélées être des agents sensibilisants, c'est le cas de l'acétate phenylmercurique (51), du para hydroxymercuribenzoate (58) qui est actif sur Micrococcus radiodurans, de l'acide iodoacétique, de l'iodoacétamide et des composés halogénés (98 - 150) qui sont également actifs sur les spores bactériennes.

La vitamine K5 possède également un pouvoir sensibilisant sur E. coli, M. radiodurans en anoxie (Sehata, 292).

IV 3. - Conditions de culture après irradiation

On sait depuis longtemps que les conditions de culture après irradiation peuvent modifier le nombre de survivants. Nous avons vu que dans certains cas les cellules peuvent réparer les lésions subies lors de l'irradiation, mais cette restauration est fonction des conditions de culture : la composition du milieu et la température d'incubation. Ce point est donc important, car comme le souligne Bridges (53), il faut connaître les conditions de culture les plus favorables de façon à détecter tout survivant éventuel lors des tests de stérilité.

IV.3.1. - Effet des milieux de culture

En 1955, Stapleton, Sbarra et Hollaender (307) ont observé que le nombre de survivants de E. coli B/r est plus élevé sur des milieux enrichis en substances organiques (extrait de levure, extraits d'organes, etc...) que sur un milieu nutritif ordinaire.

Les composés nécessaires pour obtenir une récupération maximum sont certains acides aminés tels que l'acide glutamique, la sérine, la méthionine, le tryptophane, ainsi que des bases puriques et pyrimidiques comme la guanine et l'uracile.

Les auteurs ont noté également que la nature du milieu de culture avant irradiation conditionne l'effet du milieu de numération après irradiation.

Par contre, Alper et Gillies (11) trouvent que le nombre de survivants d'E. coli B irradiée est plus faible sur les milieux optima pour le développement de la souche non irradiée. Cet effet est plus important lorsque les cultures sont irradiées en anoxie qu'en aérobiose. Les auteurs émettent l'hypothèse que l'irradiation aboutit à un déséquilibre des synthèses cellulaires, déséquilibre qui peut être en partie annulé en ralentissant la multiplication des bactéries. Cependant, ce phénomène n'est pas retrouvé par les auteurs pour d'autres souches comme E. coli B/r, E. coli 86, Shigella flexner Y6R et une souche d'E. coli K12.

Mossel (237) a étudié la survie de Salmonella typhimurium et Salmonella senftenberg irradiées dans de l'oeuf et n'a trouvé aucune différence entre du bouillon coeur-cerveille, du bouillon au tétrathionate, un milieu au vert brillant et sélénite, de la gélose nutritive. Toujours pour les Salmonella, Ley (212) a comparé 4 milieux : gélose nutritive, gélose desoxycholate citrate, gélose Mac Conkey et gélose au sang. La gélose desoxycholate citrate donne un nombre de survivants significativement plus faible. Les autres milieux ne donnent aucune différence significative, les résultats les plus reproductibles sont cependant obtenus sur gélose nutritive.

En 1966, Freeman et Bridges (131) ont étudié l'influence des milieux de culture sur la récupération après irradiation. Cinq milieux ont été utilisés (gélose sels-glucose, gélose caséine-acides aminés, gélose nutritive, gélose nutritive glucosée, et gélose au sang), et six souches tests. Aucun effet significatif du milieu n'est observé pour Streptococcus faecalis, Pseudomonas sp., Bacillus subtilis sous forme végétative ou sporulée (en fait, sur gélose glucosée, 20 % des spores seulement sont récupérées, mais ceci se produit aussi bien avec les spores témoins que les spores irradiées).

Avec E. coli B/r, les fractions survivantes sont d'autant plus importantes que le milieu est plus riche (maximum obtenu avec gélose au sang). Un effet similaire est obtenu pour Staphylococcus aureus.

Enfin, pour E. coli B, les résultats sont différents. Le nombre de survivants est plus faible sur gélose caséine acides aminés, gélose nutritive et gélose glucosée. Par contre, la récupération est aussi bonne sur gélose au sang que sur gélose synthétique.

Les auteurs recommandent d'utiliser la gélose au sang pour avoir la meilleure survie.

A peu près au même moment, Kadota et Coll. (190) ont publié un travail semblable. Les résultats pour E. coli, Serratia marcescens et Proteus morgani sont en agrément avec ceux de Stapleton et Coll. (307).

En 1965, Adler et Hardigree (2) ont étudié la récupération après irradiation de différentes bactéries : Salmonella typhimurium, Enterobacter sp., Alcaligenes, Proteus mirabilis, E. coli 7, E. coli 13, E. coli K 12, E. coli B, E. coli B/r, E. coli Bs-1. Les auteurs

observent que les radiations ionisantes modifient les mécanismes de division. Certaines souches (E. coli B , E. coli K12) après irradiation donnent des formes filamenteuses par inhibition de la formation du septum. Pour ces souches, la culture sur milieu minimum induit les mécanismes de division. Par contre, les autres souches sont mieux récupérées sur milieux riches et avec une incubation à basse température.

Cook et Widdowson (85) ont comparé le nombre de survivants de E. coli ATCC 5933 sur milieu synthétique et sur gélose peptonée. Les courbes doses survivants sont linéaires sur milieu synthétique, mais ont une forme en double exponentielle sur l'autre milieu. D'autre part, le nombre de survivants est plus élevé sur la gélose peptonée. L'effet de la concentration en phosphate a été étudié également et cette concentration affecte la capacité de récupération des cellules irradiées (la récupération diminue lorsque la concentration en HPO_4^{--} passe de 10,37 mM par litre à 165,92 mM par litre).

Previtte et Coll. (268) ont trouvé que le nombre de survivants de Salmonella typhimurium est légèrement plus élevé sur milieu minimum. L'enrichissement en extrait de levure n'augmente pas la récupération.

Nous avons vu que les travaux précédents n'ont montré aucun effet du milieu sur la survie des spores. Dans une revue générale sur la récupération des spores, Roberts (282) rapporte que des infusions de viande et l'Eugonagar donneraient dans certains cas une meilleure récupération, mais l'auteur souligne que des généralisations sont impossibles.

Deasy et Coll. (100) ont obtenu un nombre de spores de B. subtilis survivantes plus élevé sur de la gélose nutritive additionnée de 1 % de glucose par rapport à de la gélose nutritive simple.

Enfin, Chou et Coll. (66) ont étudié les effets du milieu de culture sur des spores de Pénicillium expansum irradiées. La survie est plus importante sur milieu de Gzapek que sur milieu pomme de terre glucose.

Les résultats sont donc parfois contradictoires en particulier pour les bactéries végétatives et il est donc difficile de tirer une conclusion. Certaines souches, comme E. coli B, sont mieux récupérées sur milieu minima, par contre pour la plupart des autres, la récupération est meilleure sur milieux enrichis.

IV.3.2. - Effet de la température d'incubation

Stapleton, Sbarra et Hollaender (307) ont rapporté que des températures en dessous des températures optimales de culture permettent d'obtenir une récupération plus importante d'E. coli. Mais la meilleure température varie selon la souche : elle est de 18° pour E.coli B/r, 22° pour E.coli texas et 12° pour E. coli crooks. La température de 18° donne un nombre de survivants d'E.coli B/r plus grand quelque soit la nature du milieu de culture (voir figure n° 6).

Alper et Gillies (169) confirment ce résultat pour E. coli B/r, mais par contre n'observent aucun effet de la température sur la récupération d'E. coli B.

Par contre, Adler et Hardigree (163) obtiennent une meilleure récupération de E. coli B à 42° plutôt qu'à 37°.

Pour les spores bactériennes la meilleure température semble être 37° (Roberts, 166).

Fraction survivante après irradiation
avec 65 Krads

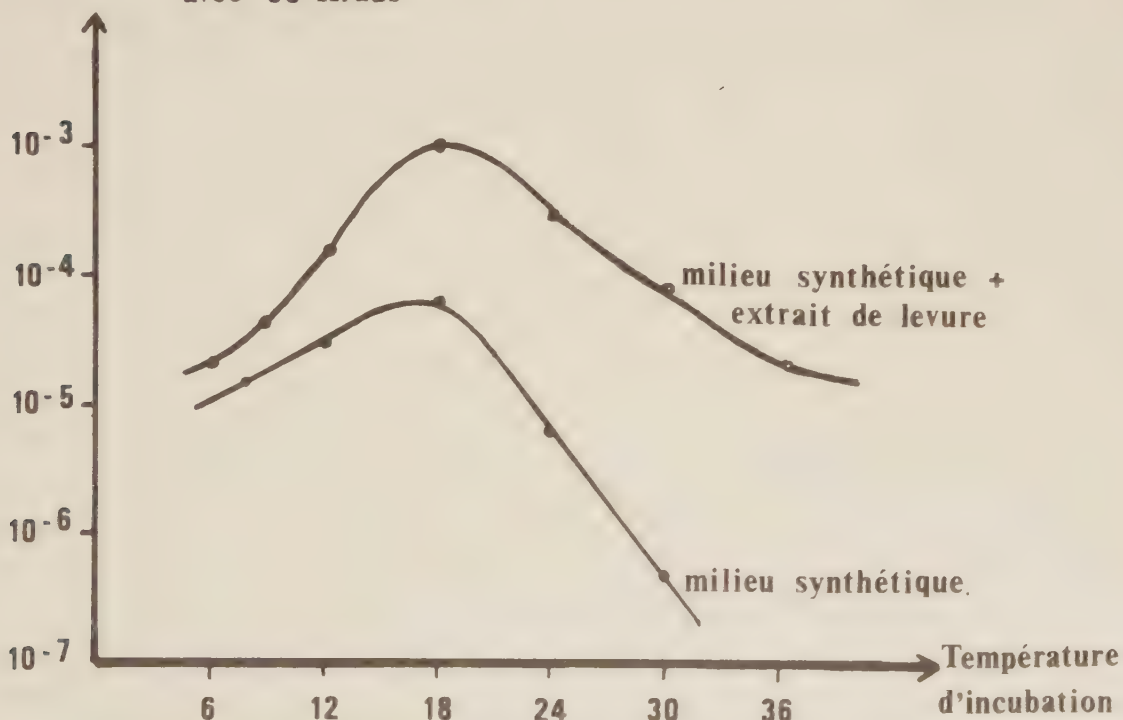


Figure 6 : VARIATION DE LA RADIOSENSIBILITE D'E.COLI B/r EN
FONCTION DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION APRES IRRADIATION

D'après STAPLETON et Coll. (307)

V - RADIOSENSIBILITE COMPAREE DES MICROORGANISMES

V - RADIOSENSIBILITE COMPAREE DES MICROORGANISMES

Nous allons voir maintenant quelle est la radiosensibilité des différents microorganismes, lorsqu'ils sont irradiés dans des conditions variables. Nous ne parlerons que de la radiosensibilité aux rayons X, γ et aux flux d'électrons accélérés car ce sont les seuls types de radiation utilisés pour la radiostérilisation. Cette radiosensibilité sera exprimée par la mesure de la D10 ou de la D37 et par la dose stérilisante minima lorsque les courbes de survie n'ont pas été déterminées.

Ces doses seront exprimées avec différentes unités de mesure, aussi nous donnons ci-dessous les facteurs de conversion :

Un roentgen = 0,877 rad dans l'air
0,98 rad dans l'eau
0,98 rad dans les tissus

Un Rep ("Roentgen equivalent physical) = 0,84 rad/g d'eau
0,93 rad/g de tissus.

Les doses en radiostérilisation sont de l'ordre du Kilorad (10^3 rad = Krad) ou du Megarad (10^6 rad = Mrad).

V.1. - Bactéries

V.1.1. - Cocci Gram +

V.1.1.1. - Staphylococcus

Seul Staphylococcus aureus sera étudié ici, car à notre connaissance aucune étude précise n'a été publiée sur Staphylococcus epidermidis. Les résultats figurent dans le tableau I. Les souches de Staphylococcus aureus étudiées ont des origines diverses : souches de collection pour Ahn (4) et Christensen (67), souches isolées en milieu hospitalier pour 3 des 6 souches étudiées par Erdman et Coll. (124 - 125) et pour Kiortis (199), enfin souches isolées de denrées alimentaires pour les 3 autres souches d'Erdman et Coll. et pour les 6 souches d'Anellis et Coll. (20). Les suspensions bactériennes ont été préparées à partir de cultures de 18 à 24 h à 37° sur milieux divers. Les numérations après irradiation ont été effectuées sur des

Tableau I : RADIOSENSIBILITE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Koh et Coll. (203)	S.aureus E 12	Suspension en eau distillée déposée sur du papier filtre.	aérobiose
	S.aureus E 13	"	
	S.eureus E 15	"	
Erdman et Coll. (124)	S.aureus Cs 68	Bouillon nutritif + 0,3 % d'extrait de levure.	aérobiose
	S.aureus Cs 30		
	S.aureus ML 15		
	S.aureus 584600		
	S.aureus D 254		
	S.aureus D 286		
Erdman et Coll. (124)	S. aureus idem	tampon phosphate	aérobiose
Erdman et Coll. (125)	S. aureus 584600	bouillon nutritif + 0,3 % d'extrait de levure	aérobiose
Powell et Bridges (264)	S. aureus	milieu liquide	aérobiose anaérobiose

1 = D10 calculée par Bridges (53) à partir de la formule D10 =

2 = D10 non citées par l'auteur, elles ont été calculées à partir des

DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

TEMPERATURE	D10 OBTENUES	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
ambiante	18 Kreps ¹	1 10 ⁸	150 Kreps
non calculée			50 Kreps 150 Kreps
ambiante	58 Kreps ²		
ambiante	16 Kreps ²		
ambiante	50 Kreps ²		
ambiante	16 Krads		
idem	44 Krads		

D inactivante
log N - log n

N = nombre de germe initial
n = nombre d'essais à chaque dose.

courbes d'inactivation publiées.

Tableau II : RADIOSENSIBILITE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Babini et Coll. (29)	S. aureus	sérum physiologique	aérobiose
	S.aureus ente- rotoxigène	sérum physiologique	aérobiose
Ahn et Coll. (4)	S.aureus 1503	sérum physiologique	aérobiose
		lyophilisé dans du sérum physiologique	aérobiose
		lyophilisé dans du milieu de Dubos	aérobiose
		lyophilisé dans une solution de glucose 1 %	aérobiose
Kiortis (199)	S. aureus	bouillon nutritif	aérobiose
Shenoy et Coll. (294)	S. aureus	tampon phosphate	aérobiose
		tampon phosphate	anaérobiose
Christensen (67)	S.aureus 209 P	désseché à partir d'une suspension en bouillon + 5 % de sérum de boeuf	
Anellis et Coll. (20)	S.aureus 1458	] tampon phosphate]	] aérobiose]
	S.aureus 293		
	S.aureus 337		
	S.aureus 315		
	S.aureus 478		
	S.aureus 493		

1 = D10 calculée d'après la courbe d'inactivation.

DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS (suite)

TEMPERATURE	D10 OBTENUES	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
ambiante		$1 \cdot 10^9$ /ml	164 Krads
ambiante		$1 \cdot 10^9$ /ml	310 Krads
ambiante	40 Krads		
ambiante	140 Krads		
ambiante	160 Krads		
ambiante	170 Krads		
ambiante	25 Krads ¹		
0°	8 Krads ¹		
0°	18 Krads ¹		
ambiante	140 Krads ¹		
- 80° C		$2 \cdot 10^6$ /ml	300 Krads
		$1,5 \cdot 10^6$ /ml	
		$1,2 \cdot 10^6$ /ml	
		$1,1 \cdot 10^6$ /ml	
		$0,9 \cdot 10^6$ /ml	
		$0,7 \cdot 10^6$ /ml	

milieux divers (TGE Difco pour Erdman et Coll., gélose nutritive pour Kiortis, gélose au sang pour Christensen, etc...)

Les courbes de survie obtenues sont toujours exponentielles, aucun épaulement n'est observé.

On peut constater que selon les conditions d'irradiation, les radiosensibilités sont très variables, mais lorsque les conditions sont comparables, il existe également des différences importantes. Erdman et Coll. (124) ainsi que Anellis et Coll. (20) qui ont étudié 6 souches, n'observent aucune différence de sensibilité entre les 6 souches.

On peut conclure que lorsque l'irradiation a lieu dans du tampon phosphate ou du sérum physiologique, les D10 sont comprises entre 8 et 18 Krads et les doses stérilisantes minima n'excèdent pas 300 Krads. Lorsque l'irradiation est faite dans du bouillon, les D10 sont plus élevées (comprises entre 25 et 58 Krads). Enfin Staphylococcus aureus irradié à l'état sec est beaucoup plus résistant (D10 comprises entre 140 et 170 Krads).

V.1.1.2. - Microcoques

En 1956, Anderson et Coll. (14) ont isolé d'échantillons de viande irradiée à 310 Mreps, une souche de Micrococcus qui s'est révélée être particulièrement résistante aux rayons ionisants. Cette souche pigmentée en rouge brun donnant des tétrades, est voisine de Micrococcus roseus, mais en raison de sa grande résistance, elle fut appelée Micrococcus radiodurans. En effet, cette souche avait pu survivre à une dose aussi élevée que 6 Mreps, ce qui dépassait la radiorésistance de toutes les souches étudiées à cette époque. Puis, il a été montré (115) que la courbe d'inactivation de Micrococcus radiodurans avait un aspect très particulier : courbe sigmoïde avec un épaulement très prononcé qui peut dépasser 1 Mrad, puis portion linéaire.

Par la suite, Micrococcus radiodurans a fait l'objet d'un très grand nombre d'études, en particulier pour essayer d'expliquer son importante radiorésistance (nous verrons dans un prochain paragraphe les raisons de cette radiorésistance élevée).

La plupart des auteurs retrouvent l'aspect de la courbe décrite primitivement avec cependant des différences dans les valeurs des D10 et de l'épaulement selon les conditions d'irradiation.

A titre d'exemple, voici le type de courbe obtenue par Driedger et Coll. (111) (figure n° 7, page 75).

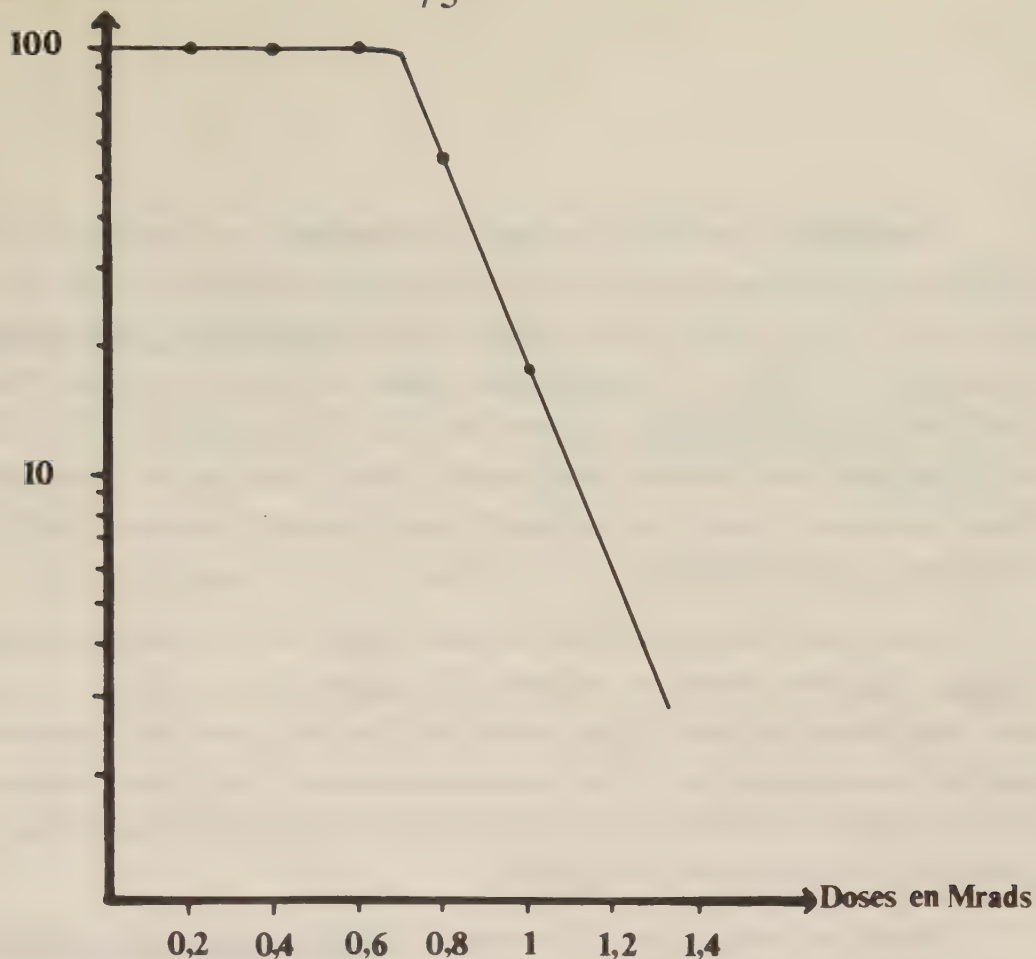


Figure 7 : COURBE DE SURVIE DE MICROCOCCUS RADIODURANS IRRADIE EN TAMPON PHOSPHATE

D'après DRIEDGER et Coll. (111)

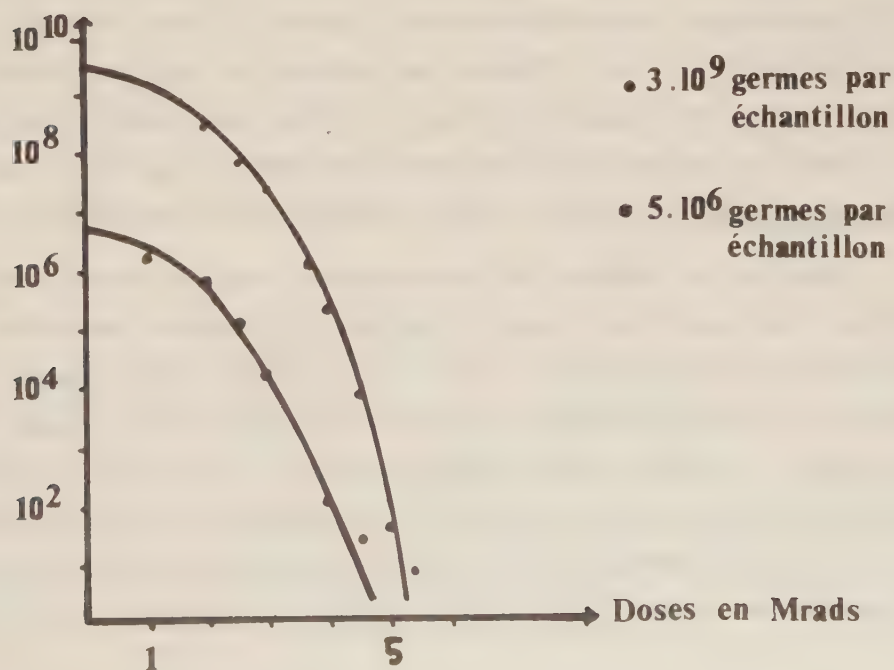


Figure 8 : COURBE DE SURVIE DE MICROCOCCUS RADIODURANS IRRADIE A L'ETAT SEC

D'après CHRISTENSEN et Coll. (67)

Cependant, certains auteurs obtiennent une courbe totalement sigmoïde sans portion linéaire. C'est en particulier le cas de Christensen et Coll. (67). Dans leur expérience, Micrococcus radiodurans a été irradiée à l'état sec (suspension dans du bouillon sérum déposée sur des feuilles de polyéthylène. Après dessiccation pendant 24 h, les feuilles de plastique sont mises sous double emballage, puis irradiées). Dans ces conditions, les échantillons étudiés se sont révélés être extrêmement radiorésistants (voir figure n° 8, page 75).

Quelques résultats sur la radiosensibilité de Micrococcus radiodurans figurent dans le tableau III (pages 77 et 78). Les résultats varient d'un auteur à l'autre, mais on constate que cette espèce microbienne est très radiorésistante, particulièrement lorsqu'elle est irradiée à l'état sec. Il faut préciser que Micrococcus radiodurans n'est pas une souche pathogène.

Dans le groupe des Micrococci, Micrococcus radiodurans n'est pas le seul à être particulièrement résistant. En effet, Davis et Coll. (97) ont isolé de filets de Haddock irradiés une souche de Microcoque (semblable morphologiquement à Micrococcus radiodurans) qui est également très résistante.

Lewis (210) rapporte en 1971 l'isolement d'une nouvelle souche de Micrococcus radiorésistante, à partir d'une variété de poisson tropical exposé à 1 ou 2 Mrads. La courbe de survie, sous rayonnement, de cette souche est sigmoïde avec un très important épaulement dépassant 1,5 Mrad. Le nouveau Micrococcus est même plus résistant que Micrococcus radiodurans lorsqu'il est irradié dans les mêmes conditions.

Enfin, en dehors de ces souches isolées dans des denrées alimentaires bien particulières, d'autres Micrococci se sont révélés radiorésistants. Christensen (74) a isolé dans des échantillons de poussière un certain nombre de souches (souches non pigmentées) radiorésistantes. La dose stérilisante pour 10^8 cellules desséchées sur des supports plastiques varie de 3 à 4 Mrads selon les souches. Österberg (246) a également isolé sur des sutures une souche de Micrococcus pigmentée en rouge dont la D10 à l'état sec est de 0,7 Mrad.

Tableau III : MICROCOCCUS

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	TEMPERATURE D'IRRADIATION
Bruce (57)	M.radiodurans R ₁	tampon phosphate	ambiante
Dharkar (107)	M.radiodurans	tampon phosphate	ambiante
Kitayama (200)	M.radiodurans	tampon phosphate	ambiante
Christensen (67)	M.radiodurans R ₁	dessication dans du bouillon sérum	ambiante
	M.radiodurans S ₈	idem	ambiante
Christensen (74)	Souches de M.ra- diodurans isolées de poussière	dessication dans du bouillon sérum	ambiante
Fox et Hopkins (129)	M.radiodurans de collection	tampon phosphate	ambiante
Suhadi et Coll. (311)	M.radiodurans	tampon phosphate	ambiante

1 = Valeurs calculées à partir de la courbe d'inactivation

RADIODURANS

EPAULEMENT Dq	D10 OBTENUES	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
300 Kreps ¹	200 Kreps ¹		
200 Krads ¹	580 Krads		
525 Krads ¹	200 Krads ¹		
		$3 \cdot 10^7$	7 Mrads
		$3 \cdot 10^9$	5,25 Mrads
		10^8	5,6 Mrads à 7,3 Mrads
650 Krads ¹	140 Krads ¹		
405 Krads	540 Krads		

V.1.1.3. - Streptococcus

V.1.1.3.1. - Streptococcus autres que les Streptococcus du

groupe D

Ils ont été assez peu étudiés jusqu'alors ; aucune courbe d'inactivation n'a été déterminée, seule la dose stérilisante a été calculée. Les résultats figurent dans le tableau IV (pages 80 - 81). Ces Streptocoques semblent donc plus résistants que Staphylococcus aureus.

V.1.1.3.2. - Streptococcus faecalis

Les résultats figurent dans le tableau V (pages 82 - 83). Dans la plupart des cas, les courbes de survie sont linéaires. Cependant, les courbes déterminées par Christensen (68) sont sigmoïdes, sans partie linéaire, si bien qu'il n'est pas possible de calculer la D10. Dyer et Coll. (117) eux obtiennent une courbe faite de 2 exponentielles, la première partie ayant une pente plus faible que la seconde.

Les Streptococcus faecalis ont une radiorésistance voisine des autres Streptocoques cités ci-dessus.

V.1.1.3.3. - Streptococcus faecium

En 1964, Christensen et Coll. (68) isolent d'échantillons de poussière des souches de Streptococcus faecium qui s'avèrent très radiorésistantes puisqu'elles survivent à une dose d'irradiation de 2 Mrads. Comme la radiorésistance de ces souches est du même ordre que celle des spores bactériennes et que S. faecium est une espèce potentiellement pathogène, les auteurs décident donc d'étudier la sensibilité aux rayons ionisants des Streptococcus faecium. 24 souches furent testées, 19 souches de laboratoire et 5 récemment isolées. Ces souches sont irradiées après dessiccation dans du bouillon sérum. Toutes apparaissent plus radiorésistantes que les Streptococcus faecalis étudiés parallèlement, mais il existe des différences importantes entre les souches. Les courbes de survie obtenues sont sigmoïdes sans épaulement individualisé, ni portion linéaire, comme on peut le voir sur la figure suivante n° 9 (page 85).

Tableau IV : RADIOSENSIBILITE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION
Koh et Coll. (203)	S.pneumoniae I _{E54} S.pneumoniae III _{E55} S.pneumoniae I _{E102} S.pneumoniae II _{E103} S.pneumoniae III _{E104} S.pneumoniae IV _{E105} Streptococcus pyogenes	Suspension en eau distillée déposée sur des disques de papier filtre
Babini et Gubetta (29)	St. pyogenes St. agalactiae	sérum physiologique sérum physiologique

DE STREPTOCOCCUS DIVERS

ATMOSPHERE	TEMPERATURE D'IRRADIATION	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
aérobiose	ambiante	non précisé	400 Kreps
		"	500 Kreps
		"	400 Kreps
		"	400 Kreps
		"	450 Kreps
		"	450 Kreps
		$9,2 \cdot 10^5$	300 Kreps
aérobiose	ambiante	environ 10^9 /ml	406 Krads
aérobiose	ambiante	idem	344 Krads

Tableau V : RADIOSENSIBILITE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Erdman et Coll. (124)	S.faecalis isolé de denrées ali- mentaires	bouillon nutritif + extrait de levure	aérobiose
	même souche	tampon phosphate	aérobiose
De Saint-Aubert et Coll. (285)	S.faecalis isolé de denrées ali- mentaires	jambon en conserve	
Dharkar (107)	S.faecalis NP	tampon phosphate	
Dyer et Coll. (117)	S.faecalis NP	bouillon + 5 % d'extrait de levure	aérobiose
Powell et Bridges (264)	S.faecalis 10C ₁	milieu liquide	aérobiose
	même souche	milieu liquide	anaérobiose
Pleceas et Arizan (254)	S.faecalis 776 de collection	tampon phosphate	aérobiose
Christensen (68)	12 souches de S. faecalis	desséchées dans du sérum + 5 % de sérum	aérobiose
Anellis et Coll. (20)	S.faecalis isolé de denrées ali- mentaires	tampon phosphate	aérobiose

1 = D10 non citée par l'auteur, mais calculée à partir de la courbe d'inactivation.

NP = Origine non précisée

DE STREPTOCOCCUS FAECALIS

TEMPERATURE D'IRRADIATION	D10 OBTENUES	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
ambiante	120 Krads ¹		
ambiante	21 Krads ¹		
10° C		10^3 à 10^4 /g	300 Krads
ambiante	37 Krads		
ambiante		10^7 /ml	500 Krads
ambiante	70 Krads		
ambiante	150 Krads		
ambiante	76 Krads		
ambiante		10^8	de 1,5 à 1,8 Mrad
- 80° C		10^6 /ml	0,9 Mrad

Les auteurs poursuivent leurs travaux et en 1967 (71), ils publient les résultats obtenus avec 48 souches (20 souches "hospitalières" et 28 souches isolées de prélèvements de poussière). On peut voir sur les figures n° 10 et 11 (page 85) la répartition des radiorésistances.

Il existe donc des différences de résistance entre les souches, mais dans l'ensemble cette espèce est particulièrement résistante puisque sur 48 souches, 14 sont inactivées par une dose supérieure à 3 Mrads.

Nous verrons plus loin, que ces résultats seront à la base du choix par la Pharmacopée Danoise, de la dose à appliquer pour la radiostérilisation du matériel médico-chirurgical à usage unique.

D'autres travaux ultérieurs ont tous confirmé la grande radiorésistance de Streptococcus faecium (les résultats figurent dans le tableau VI, page 86).

Dans la plupart des cas, les courbes de survie sont sigmoïdes avec ou sans partie exponentielle. Cependant Anellis et Coll. (20) obtiennent des courbes composites avec 2 exponentielles (voir figures n° 12 et 13, page 88). Ils ont utilisé quatre souches de S. faecium provenant du laboratoire de Christensen ; les irradiations ont été faites en tampon phosphate à - 80° C pour les souches Q12, F6 et FEG et à + 5° C , - 30° C, - 80° C, - 140° C et - 196° C pour la souche A21. Dans tous les cas, la courbe est composite, le changement de pente survenant entre 0,3 et 0,5 Mrad. Les D10 correspondant à la partie B de la courbe (c'est à dire celle qui a la pente la plus faible) sont 2 à 3 fois plus élevées que celles correspondant à la partie A.

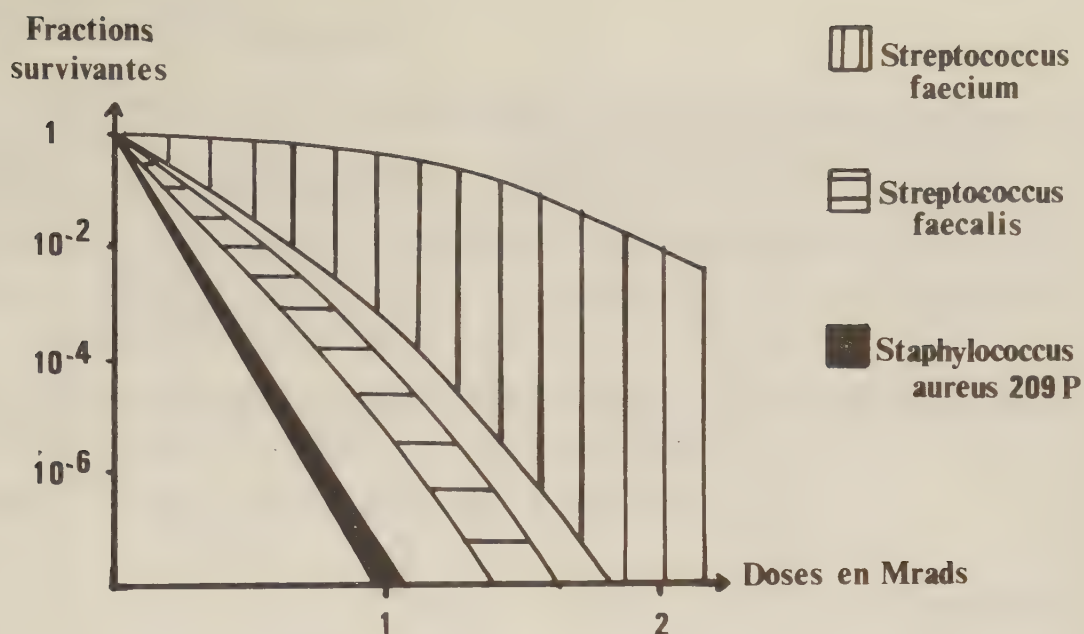


Figure 9 : INACTIVATION PAR IRRADIATION D'UN CERTAIN NOMBRE DE SOUCHES DE S.FAECALIS ET S.FAECIUM

D'après CHRISTENSEN (68)

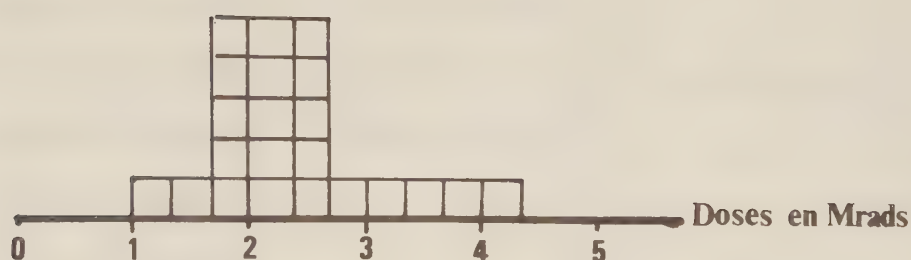


Figure 10 : RADIORESISTANCE DE 20 SOUCHES DE LABORATOIRE DE STREPTOCOCCUS FAECIUM (la radiorésistance est exprimée par la dose nécessaire pour inactiver 10^8 germes)

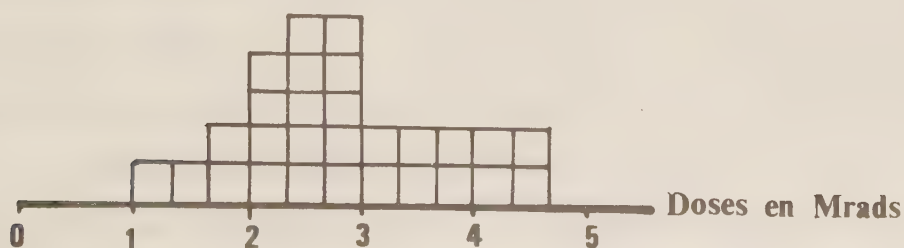


Figure 11 : RADIGRESISTANCE DE 28 SOUCHES DE STEPTOCOCCUS FAECIUM ISOLEES DE PRELEVEMENTS DE POUSSIÈRE

D'après CHRISTENSEN et Coll. (71)

Tableau VI : RADIOSENSIBILITE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Christensen et Coll. (71)	48 souches	dessication à par- tir de suspension en bouillon sérum	aérobiose
Matsuyama et Coll. (231)	S.faecium R 298	tampon phosphate	aérobiose
	S.faecium R 298	bouillon coeur- cervelle	aérobiose
	"	"	aérobiose
	"	"	anaérobiose
	S.faecium R 53	bouillon coeur- cervelle	aérobiose
	"	"	aérobiose
Anellis et Coll. (20)	"	"	anaérobiose
	S.faecium F 6	tampon phosphate	aérobiose
	S.faecium O 12	tampon phosphate	aérobiose
	S.faecium FEC	tampon phosphate	aérobiose
	S.faecium ★ 21	tampon phosphate	aérobiose
	"	tampon phosphate	aérobiose
	"	tampon phosphate	aérobiose
	"	tampon phosphate	aérobiose
De Saint Aubert et Coll. (285)	"	tampon phosphate	aérobiose
	S.faecium	jambon en conserve	anaérobiose partielle
Ley et Coll. (214)	S.faecium	tampon phosphate	aérobiose

1 = D10 obtenues lors de deux expérimentations.

2 = courbes composites, D10 correspondant aux deux pentes.

DE STREPTOCOCCUS FAECIUM

TEMPERATURE D'IRRADIATION	D10, en Krads	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
ambiante		10^8	1 à 4,5 Mrads
10 - 13° C	64		
10 - 13° C	62 à 69		
- 79° C	285		
- 79° C	285		
10 - 13° C	64 ou 120 ¹		
- 79° C	310		
- 79° C	300		
- 80° C	120 ; 190 ²		
- 80° C	100 ; 320 ²		
- 80° C	80 ; 130 ²		
+ 5° C	30 ; 90 ²		
- 30° C	110 ; 240 ²		
- 80° C	100 ; 330 ²		
- 140° C	140 ; 370 ²		
- 196° C	150 ; 380 ²		
+ 10° C		10^4 à 10^5 g/ gramme	1,5 Mrad
ambiante	83		

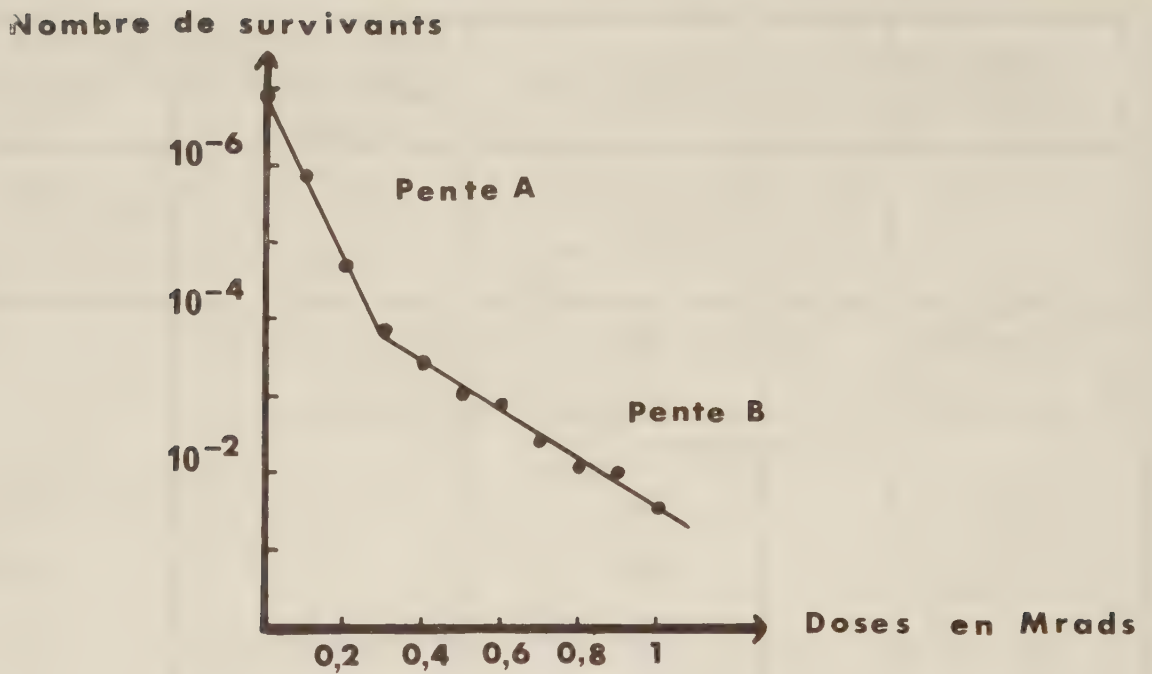


FIGURE 12 Courbe de survie de *Streptococcus faecium* A₂₁ irradié à -80°
D'après Anellis et coll (20)

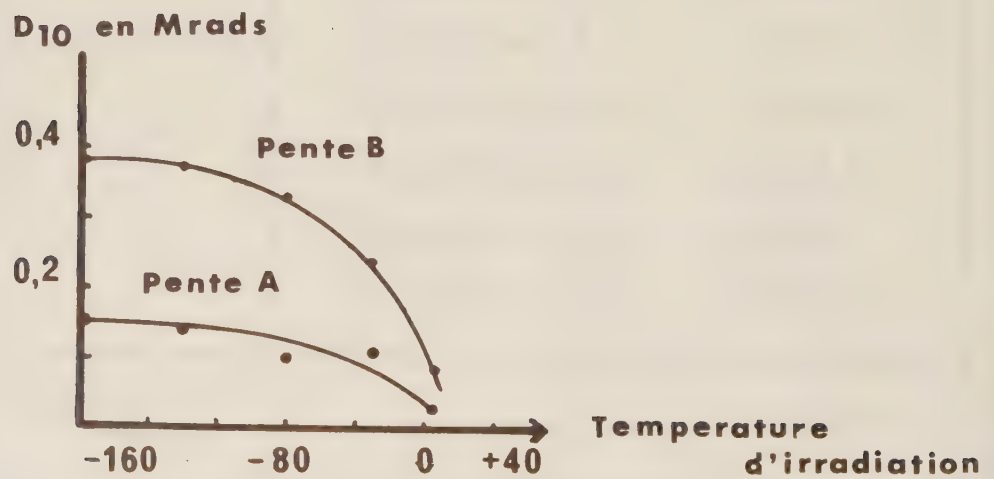


FIGURE 13 Variations de la radioresistance de *Streptococcus faecium* A₂₁ en fonction de la température d'irradiation
D'après Anellis et coll (20)

V.1.2. - Bacilles Gram négatif

V.1.2.1. - E. coli

Un grand nombre de travaux ont été effectués avec E. coli, en particulier pour l'étude des mécanismes léthaux des rayons ionisants, ainsi que des facteurs modifiant la radiosensibilité. Différentes souches ont été utilisées, E. coli B, E. coli Bs-1 (mutant radiosensible de E. coli B), E. coli B/r (mutant radiorésistant) et diverses autres souches, (souches de collection ou souches isolées de denrées alimentaires).

Les résultats figurent dans les tableaux VII, VIII, IX et X, (pages 90 à 97).

Un point important doit être signalé : les courbes doses-survivants ont une forme différente selon les souches et les conditions techniques d'étude.

Ainsi dans certains cas, les courbes sont composites donc formées de deux exponentielles. Mais deux éventualités sont possibles :

- la première partie de la courbe a une pente plus faible que la seconde ; c'est ce qu'obtiennent Günter et Kohn (155) avec E. coli W 1485, Friesen et Coll. (134) avec E. coli B et Bs-1.
- la première partie a une pente plus forte que la seconde. Ceci est nettement observé par Matsuyama et Coll. (231) avec E. coli B/r, mais uniquement lorsque l'irradiation a lieu en anaérobiose à + 10° C, et en aérobiose à - 78° C. La pente de la première portion de la courbe est identique aux trois températures testées, par contre celle de la seconde portion varie selon les conditions d'irradiation.

Des courbes légèrement sigmoïdes en anaérobiose sont également obtenues avec E. coli B/r par Cramp (90 - 91).

Les différences de forme des courbes de survie ne sont pas totalement expliquées par les auteurs. Cependant Günter et Kohn (155) pensent que cela provient d'une hétérogénéité génétique.

Si l'on compare maintenant les radiosensibilités, E. coli B/r est nettement plus résistant que E. coli B et Bs-1. La radiosensibilité des souches diverses d'E. coli est intermédiaire entre E. coli B et B/r ou voisine de E. coli B/r.

Tableau VII : RADIOSENSIBILITE

REFERENCES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE	TEMPERATURE D'IRRADIATION
Stapleton, Sbarra et Hollaender (307)	tampon phosphate tampon phosphate	aérobiose aérobiose	0° 0°
Matsuyama et Coll. (231)	tampon phosphate tampon phosphate tampon phosphate tampon phosphate bouillon coeur- cervelle " " "	aérobiose aérobiose anaérobiose anaérobiose aérobiose aérobiose anaérobiose anaérobiose	10 - 13° C - 79° C 10 - 13° C - 79° C 10 - 13° C - 79° C 10 - 13° C - 79° C
Friesen et Coll. (134)	tampon phosphate	aérobiose	ambiante
Pollard (259)	tampon	aérobiose	
Cramp et Coll. (90)	sérum physiologique sérum physiologique	aérobiose anaérobiose	ambiante ambiante
Cramp et Coll. (91)	tampon tris tampon tris	aérobiose anaérobiose	ambiante
Cramp et Coll. (92)	tampon tris tampon tris	aérobiose anaérobiose	ambiante ambiante
Anellis et Coll. (20)	tampon phosphate	anaérobiose	- 80° C
Shenoy et Coll. (295)	tampon phosphate tampon phosphate tampon phosphate	aérobiose anoxie N ₂ O	ambiante ambiante ambiante
Shenoy et Coll. (296)	tampon phosphate " bouillon nutritif "	aérobiose anaérobiose aérobiose anaérobiose	ambiante " ambiante "

1 = incubation dans milieu synthétique à 37°

2 = incubation dans milieu synthétique + extrait de levure à 18°

3 = courbe sigmoïde, les deux D10 correspondent à la pente initiale et

* = D10 non citées par les auteurs, mais calculées à partir des courbes

DE E. COLI B/r

D 10	D 37	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
10 Krads 1*			
30 Krads 2*			
21 Krads			
110 Krads, 40 Krads ³			
110 Krads, 39 Krads ³			
110 Krads, 49 Krads ³			
30 Krads			
NC , 79 Krads ³			
NC , 54 Krads ³			
120 Krads, NC			
12 Krads *			
	3 Krads		
15 Krads *			
37 Krads *			
	5 Krads		
	21 Krads		
13,5 Krads *			
55 Krads *			
		1,9 10 ⁶	0,3 Mrads
16 Krads			
32,5 Krads			
30 Krads			
12 Krads			
37 Krads			
14 Krads			
43,5 Krads			

finale - NC : non calculable.

d'inactivation.

Tableau VIII : RADIOSENSIBILITE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Alper et Gillies (11)	E.coli B	tampon phosphate	aérobiose
	E.coli B	tampon phosphate	anaérobiose
Pollard (259)	E.coli B		aérobiose
Pollard (259)	E.coli Bs-1		aérobiose
Cramp et Coll. (90)	E.coli Bs-1	sérum physiolo- gique	aérobiose
	E.coli Bs-1	sérum physiolo gique	anaérobiose
Cramp et Coll. (91)	E. coli Bs-1	tampon tris	aérobiose
	E. coli Bs-1	tampon tris	anaérobiose
Pollard (259)	E.coli K 12		aérobiose
Brustad (60)	E.coli K 12	tampon phosphate	aérobiose
	E.coli K 12	tampon phosphate	anaérobiose
Friesen et Coll. (134)	E.coli K12 AB 2480	tampon phosphate	aérobiose
	E.coli K12 AB 2463	tampon phosphate	"
	E.coli K12 AB 1886	tampon phosphate	"
	E.coli K12 AB 2497	tampon phosphate	"

* D10 non citées par les auteurs, elles ont été calculées à partir des

D'ESCHERICHIA COLI B, Bs-1, K 12

TEMPERATURE	D 10	D 37
ambiante	5 Krads *	
ambiante	17 Krads *	
ambiante		3,2 Krads
ambiante		1,8 Krad
ambiante	3 Krads *	
ambiante	5,5 Krads *	
ambiante		2,3 Krads
ambiante		4,6 Krads
ambiante		7,8 Krads
ambiante	2,8 Krads	
ambiante	5,4 Krads	
ambiante	2,3 Krads	
"	3,8 Krads	
"	14 Krads	
"	15,3 Krads	

courbes de survie publiées.

Tableau IX : RADIOSENSIBILITE DE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION
Gunter et Kohn (155)	E.coli W 1485	tampon phosphate
Erdman et Coll. (124)	E.coli I	tampon phosphate
	E.coli I	bouillon + extrait de levure
	E.coli II	bouillon + extrait de levure
Erdman et Coll. (125)	E.coli	tampon phosphate
	même souche	tampon phosphate
	"	bouillon + extrait de levure
	"	"
Cook et Coll. (85)	E. coli NCTC 5933	eau distillée
Dyer et Coll. (117)	E. coli	bouillon nutritif
Pleceas et Arizan (254)	E. coli MB 20 + 3 E. coli isolés d'eaux polluées	tampon phosphate
Pleceas et Coll. (255)	E. coli MB 20	eau distillée

1 = Courbe composite, les deux D10 correspondent aux pentes initiale

2 = non citées par les auteurs, mais calculées à partir des courbes

DIVERSES SOUCHES D'E. COLI

ATMOSPHERE	TEMPERATURE D'IRRADIATION	D 10
aérobiose	ambiante	5 Kreps ¹ 11 Kreps
aérobiose	ambiante	8,3 Kreps ²
aérobiose	ambiante	25 Kreps ²
aérobiose	ambiante	34 Kreps ²
aérobiose	ambiante	6 Kreps ²
aérobiose	- 78° C	23 Kreps ²
aérobiose	ambiante	17,5 Kreps ²
"	- 78° C	41 Kreps
aérobiose	ambiante	8 Krads ²
aérobiose	ambiante	63 Krads ²
aérobiose	ambiante	36 Krads ²
aérobiose	ambiante	28 Krads

et finale.

de survie.

Tableau X : RADIOSENSIBILITE DE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION
Thieulin et Coll. (326)	E. coli isolé de denrée alimentaire	oeuf complet
De Saint-Aubert et Coll. (285)	E. coli	jambon en conserve
Babini et Gubetta (29)	E. coli	sérum physiologique
Anellis et Coll. (20)	E. coli 198 E. coli 2985-66 E. coli 1711-64 E. coli 3543-66	tampon phosphate " " "
Koh et Coll. (203)	E. coli E 38	suspension en eau distillée déposée sur des disques de papier filtre

DIVERSES SOUCHES D'E. COLI

ATMOSPHERE	TEMPERATURE D'IRRADIATION	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
Anaérobiose partielle	- 20° C	$6 \cdot 10^3 / g$	250 Krads
anaérobiose partielle	+ 10° C	$10^4 \text{ à } 10^5 / g$	200 Krads
aérobiose	ambiante	$1 - 10^9 / ml$	220 Kreps
aérobiose	- 80° C	$2 \cdot 10^6 / ml$	300 Kreps
"	"	$2 \cdot 10^6 / ml$	300 Kreps
"	"	$1,9 \cdot 10^6 / ml$	300 Kreps
"	"	$2,1 \cdot 10^6 / ml$	600 Kreps
aérobiose	ambiante	$2 \cdot 10^8$	75 Kreps

On constate par ailleurs que selon les conditions d'irradiation (milieu, température, atmosphère) la radiosensibilité est modifiée de façon importante.

En conclusion, E. coli a une radiorésistance faible qui est inférieure à celle de nombreux cocci Gram positif.

V.1.2.2. - Klebsiella - Enterobacter - Serratia

Les tableaux XII et XIII (pages 99 à 102) montrent quelques résultats relevés dans la littérature. Malgré des différences selon les auteurs, il apparaît que ces espèces sont peu radiorésistantes. Elles ont des radiosensibilités proches de celles d'E. coli. Des trois espèces, Serratia marcescens est la plus sensible. Bartlett et Coll. (33) observent une corrélation entre pigmentation et radiosensibilité puisque leurs deux souches pigmentées ont les D10 les plus faibles.

V.1.2.3. - Proteus

Quelques résultats ont pu être colligés dans la littérature (voir tableau XIV, pages 103 - 104).

Proteus vulgaris a une radiosensibilité proche des entérobactéries précédemment citées.

V.1.2.4. - Shigella

Quelques résultats figurent dans le tableau XV (pages 105 - 106).

Il n'est pas possible de comparer la sensibilité de Sh. flexner et celle des autres Shigella étudiées puisque les irradiations ont été faites dans des milieux différents. Par contre, Sh. paradysenteriae, dysenteriae et sonnei ont été irradiées dans les mêmes conditions et cette dernière semble plus résistante que les deux autres.

Tableau XII : RADIOSENSIBILITE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Koh et Coll. (203)	Klebsiella pneumoniae E 26	suspensions en eau distillée dé- posées sur du papier filtre	aérobiose
Koh et Coll. (203)	Enterobacter aerogenes E 107	suspension en eau distillée déposée sur du papier filtre	aérobiose
Goldblith et Coll. (145)	E. aerogenes idem	bouillon nutritif "	aérobiose aérobiose partielle
Erdman et Coll. (124)	E. aerogenes	bouillon nutritif + 0,3 % d'extrait de levure	aérobiose
Anellis et Coll. (20)	E. aerogenes type I E. aerogenes 4211-65 E. aerogenes 3228-65	tampon phosphate tampon phosphate "	aérobiose " "
Erdman et Coll. (125)	E. cloacae	bouillon nutritif + 0,3 % d'extrait de levure	aérobiose

1 = D10 calculées par Bridges (53).

2 = D10 calculées à partir des courbes d'inactivation.

DES KLEBSIELLA, ENTEROBACTER

TEMPERATURE	D 10	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
ambiante	24 Kreps ¹	1,1 10 ⁸	0,2 Mrep
	22 Kreps ¹	4 10 ⁸	0,15 Mrep
ambiante	5,6 Kreps ¹	3,25 10 ⁸	0,05 Mrep
ambiante	9,2 Kreps		
ambiante	11 Kreps		
ambiante	23 Kreps ²		
- 80° C		0,9 10 ⁶ /ml	0,3 Mrad
"		2,5 10 ⁶ /ml	0,3 Mrad
"		2,7 10 ⁶ /ml	0,6 Mrad
ambiante	23 Kreps ²		

Tableau XIII : RADIOSENSIBILITE DE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Koh et Coll. (203)	S.marcescens	suspension en eau distillée déposée sur du papier filtre	aérobiose
Anellis et Coll. (20)	S.marcescens QMB 1466 S.marcescens QMB 1455 S.marcescens QMB 1563	tampon phosphate " "	aérobiose " "
Redpath (277)	S.marcescens idem idem idem	tampon phosphate tampon phosphate bouillon nutritif bouillon nutritif	aérobiose anaérobiose aérobiose anaérobiose
Bartlett et Coll. (33)	S.marcescens "sau- vage" (souche pig- mentée S.marcescens R25 (souche pigmentée) S.marcescens WF (non pigmentée) S.marcescens 9.3.3. (non pigmentée) S.marcescens DB100 (non pigmentée	milieu synthéti- que +10g/l de glycérol " " " "	aérobiose " " " "

1 = D10 non précisées par les auteurs, calculées à partir des courbes pu-
bliées.

NP = non précisé.

SER ATIA MARCESCENS

TEMPERATURE	D 10	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
ambiante		NP	0,05 Mrep
- 80° C		$1,9 \cdot 10^6$	0,3 Mrad
"		$1,8 \cdot 10^6$	0,3 Mrad
"		$0,4 \cdot 10^6$	0,3 Mrad
ambiante	4 Krads ¹		
ambiante	12 Krads ¹		
ambiante	5 Krads ¹		
ambiante	21 Krads ¹		
ambiante	10 Krads ¹		
"	13 Krads ¹		
"	17 Krads ¹		
"	19 Krads ¹		
"	21 Krads ¹		

Tableau XIV : RADIOSENSIBILITE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Koh et Coll. (203)	Proteus vulgaris	Suspension en eau distillée déposée sur du papier filtre	aérobiose
Anellis et Coll. (20)	Proteus vulgaris QMB 1563	tampon phosphate	aérobiose
Dyer et Coll. (117)	Proteus vulgaris	bouillon + extrait de levure	aérobiose
Pleceas et Coll. (254)	Proteus vulgaris OX 19 + 3 souches iso- lées de produits pathogènes	tampon phosphate	aérobiose

NP = non précisé

1 = D10 non citée par les auteurs, mais calculée à partir des courbes publiées.

DE PROTEUS VULGARIS

TEMPERATURE D'IRRADIATION	D 10	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
ambiante		NP	0,05 Mrep
- 80° C		$0,4 \cdot 10^6$	0,3 Mrad
ambiante	36 Krads ¹		
ambiante	26 Krads ¹		

Tableau XV : RADIOSENSIBILITE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION
Cramp et Coll. (146 - 152)	S. flexner Y 65	solution saline
	S. flexner Y 65	solution saline
Dyer et Coll. (117)	S. sonnei	bouillon + extrait de levure
	S. paradysenteriae	bouillon + extrait de levure
	S. dysenteriae	bouillon + extrait de levure

DES SHIGELLA

ATMOSPHERE	TEMPERATURE D'IRRADIATION	D 10
aérobiose	ambiante	8 ou 9 Krads
anaérobiose	ambiante	28 ou 31 Krads
aérobiose	ambiante	54 Krads
aérobiose	ambiante	40 Krads
aérobiose	ambiante	32 Krads

V.1.2.5. - Radiosensibilité des Salmonella

L'utilisation des rayons ionisants comme moyen de décontamination de certaines denrées alimentaires (radiopasteurisation en quelque sorte) a été étudiée de façon extensive ces vingt dernières années. De nombreux travaux ont donc été effectués sur la radiosensibilité des *Salmonella* lorsqu'elles sont irradiées dans différentes conditions. Les résultats figurent dans les tableaux XVI à XXI (pages 108 à 119).

En tampon phosphate ou en bouillon, la radiosensibilité des *Salmonella* est voisine de celles des autres enterobactéries. En général, dans un milieu complexe comme de la viande ou de l'oeuf, les D10 sont augmentées par un facteur de 2 à 5. Cependant Previtte et Coll. (268) ont noté que deux souches de *S. typhimurium* avaient une radiosensibilité plus faible dans de la viande de poulet que dans un bouillon (en fait bouillon coeur-cervelle donc riche en protéines).

Dans des denrées alimentaires les courbes de survie ne sont pas toujours exponentielles. Ainsi Dyer et Coll. (117) ont montré que *S. typhi*, *S. paratyphi B* et *S. wichita* irradiées dans de la chair de crabe étaient inactivées selon une loi complexe. En effet, la pente de la courbe devient très faible aux fortes doses, l'inactivation des derniers survivants est donc plus difficile ("tailing" effect).

L'irradiation à basse température, en anaérobiose ou dans des produits deshydratés entraîne également une diminution de la radiosensibilité (212 - 268 - 329).

La comparaison des radiosensibilités d'un même sérotype ou de sérotypes différents est parfois difficile, cependant lorsque les conditions d'irradiation sont comparables les résultats sont relativement concordants.

Dans un milieu protecteur (bouillon, oeuf, viande), les D10 varient de 40 à 80 Krads, cependant *S. typhimurium* irradiée dans du poulet à -80° C a une D10 de 293 Krads (268) et *S. senftenberg* dans de la farine de poisson a une D10 de 188 à 192 Krads (340).

Il semble qu'il existe des différences de sensibilité entre les différents sérotypes. Ley (212) a montré dans une étude sur *S. gallinarum*, *S. senftenberg*, *S. typhimurium* et *S. paratyphi B* que ces 2 dernières étaient les plus résistantes, *S. senftenberg* étant par contre la plus sensible.

Tableau XVI : RADIOSENSIBILITE DE SALMONELLA TYPHI -

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Dyer et Coll. (117)	S. typhi	bouillon + extrait de levure	aérobiose
	S. typhi	chair de crabe	aérobiose
Bonet-Maury et Coll. (42)	S. typhi TY2	eau physiologique	NP
	"	bouillon	NP
	"	milieu glucosé	NP
Pleceas et Coll. (254)	S. typhi 0901	tampon phosphate	aérobiose
Koh et Coll. (203)	S. typhi	suspension en eau distillée déposée sur papier filtre	aérobiose
Ley (212)	S. paratyphi B	tampon phosphate	aérobiose
	"	"	aérobiose
	"	"	anaérobiose
	"	viande cheval	
Dyer et Coll. (117)	S. paratyphi B	bouillon + extrait de levure	aérobiose
	"	chair de crabe	aérobiose
Koh et Coll. (203)	S. paratyphi B	suspension en eau distillée déposée sur du papier filtre	aérobiose

NP = non précisé

SALMONELLA PARATYPHI B

TEMPERATURE D'IRRADIATION	D 10 en KRADS	DOSES STERILISANTES	
		Nombre initial de germes	Doses
3 à 5° C	59		
3 à 5° C		10^6 /g	700 Krads
NP		10^9 /ml	90 Krads
NP		10^9 /ml	500 Krads
NP		10^9 /ml	250 Krads
ambiante	47		
ambiante		NP	250 Krads
ambiante	19		
< 0° C	49,4		
ambiante	69,5		
< 0° C	93,1		
3 - 5° C	72		
3 - 5° C		10^6 /g	600 Krads
ambiante		NP	100 Krads

Tableau XVII : RADIOSENSIBILITE DE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION
Ley (212)	S. typhimurium	tampon phosphate
	"	"
	"	"
	"	oeuf complet liquide
	"	"
	"	viande cheval
Thornley (329)	S. typhimurium	oeuf complet liquide
	S. typhimurium	oeuf complet desséché
Previtte et Coll. (268)	S. typhimurium SR 11	bouillon
	"	"
	"	"
	"	poulet
	"	"
	"	"
	S. typhimurium R1 A	bouillon
	"	"
	"	"
	"	poulet
	"	"
	"	"
Previtte et Coll. (268)	S. typhimurium R1 A	poulet

NP = non précisé

SALMONELLA TYPHIMURIUM

ATMOSPHERE	TEMPERATURE D'IRRADIATION	D 10 en KRADS
aérobiose	ambiante	20,8
anaérobiose	ambiante	61,9
NP	< 0° C	31,9
	ambiante	63
	< 0°C	68
	< 0° C	128
	ambiante	40
	ambiante	50 à 58
aérobiose	22° C	49 à 55
"	4° C	49 à 56
"	- 20° C	64 à 84
aérobiose	22° C	39 à 46
"	4° C	41 à 47
"	- 20° C	63 à 83
aérobiose	22° C	71 à 78
"	4° C	77 à 84
"	- 20° C	96 à 122
"	22° C	54 à 62
"	4° C	65 à 74
"	- 20° C	88 à 105
aérobiose	- 80° C	293

Tableau XVIII : RADIOSENSIBILITE DE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Licciardello et Coll. (219)	S. typhimurium ATCC 7823	poulet	aérobiose
Thieulin et Coll. (326)	S. typhimurium	oeuf complet	anaérobiose partielle
De Saint Aubert (285)	S. typhimurium	jambon	anaérobiose partielle
Comer d'après Thornley (329)	S. typhimurium	oeuf complet	
Anellis et Coll. (20)	S. typhimurium R1 A	tampon phosphate	aérobiose

SALMONELLA TYPHIMURIUM (Suite)

TEMPERATURE D'IRRADIATION	D 10	DOSES STERILISANTES	
		Nombre initial de germes	Doses
0° C	70 Krads		
< 0° C		10^5 à 10^6 /g	250 Krads
10° C		10^3 à 10^4 /g	300 Krads
< 0° C	60 Krads	10^7 /g	420 Krads
- 80° C		$2,1 \cdot 10^6$ /ml	300 Krads

Tableau XIX : RADIOSENSIBILITE DE SALMONELLA

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Previtte et Coll. (270)	S.enteritidis	bouillon coeur- cervelle	aérobiose
Comer d'après Thornley (329)	S.enteritidis	oeuf complet	
Dyer et Coll. (117)	S.enteritidis	bouillon + extrait de levure	aérobiose
Thieulin et Coll. (326)	S.enteritidis	oeuf complet	anaérobiose partielle
Babini et Coll. (29)	S.enteritidis	sérum physiologi- que.	aérobiose
Ley (212)	S.gallinarum pullorum	tampon phosphate	aérobiose
	"	"	"
	"	"	anaérobiose
	"	oeuf complet	
	"	"	
Comer cité par Thornley (329)	S.gallinarum pullorum	oeuf complet	
Dyer et Coll. (117)	S.gallinarum pullorum	bouillon + extrait de levure	aérobiose
Erdman et Coll. (124)	S.gallinarum pullorum	tampon phosphate	aérobiose
	"	bouillon + extrait de levure	aérobiose
Thieulin et Coll. (326)	S.gallinarum pullorum	oeuf complet	anaérobiose partielle

1 = D10 non citées par les auteurs, mais calculées à partir des courbes publiées.

ENTERITIDIS ET GALLINARUM PULLORUM

TEMPERATURE	D10 en KRADS	DOSES STERILISANTES	
		Nombre initial de germes	Doses en Krads
4° C	42		
< 0° C	53		
3 - 5° C	22,5 ¹		
< 0° C		10 ⁵ et 10 ⁶ /g	375
ambiante		10 ⁹ /ml	418
ambiante	13,2		
< 0° C	21,1		
ambiante	36,3		
ambiante	43		
< 0° C	56,9		
< 0° C	59		
3 - 5° C	40 ¹		
ambiante	16,4 ¹		
ambiante	50		
< 0° C		10 ⁴ à 10 ⁵ /g	250

Tableau XX : RADIOSENSIBILITE DE S.THOMPSON,

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Licciardello et Coll. (219)	S. thompson ATCC 8391	viande poulet	aérobiose
Previtte et Coll. (270)	S. thompson	bouillon coeur- cervelle	aérobiose
Previtte et Coll. (270)	S. heidelberg	bouillon coeur- cervelle	aérobiose
Anellis et Coll. (20)	S. heidelberg	tampon phosphate	aérobiose
Licciardello et Coll. (219)	S. heidelberg ATCC 8926	viande de poulet	aérobiose
Comer d'après Thornley (329)	S. heidelberg	oeuf complet	
Previtte et Coll. (270)	S. newport	bouillon coeur- cervelle	aérobiose
Licciardello et Coll. (219)	S. newport ATCC 6932	viande de poulet	aérobiose
Underdal et Rossebo (340)	10 souches de S. senftenberg	tampon phosphate	aérobiose
	"	farine de poisson	"
Ley (212)	S. senftenberg	tampon phosphate	aérobiose
	"	"	anaérobiose
	"	"	"
	"	oeuf complet	-
	"	"	-

1 = Courbes sigmoïdes - les D10 citées sont les D10 moyennes.

S. HEIDELBERG, S. SENFTENBERG

TEMPERATURE	D10 en KRADS	DOSES STERILISANTES	
		Nombre initial de germes	Doses
0°C	70 ¹		
4° C	84		
4° C	75		
- 80° C		1,7. 10 ⁶ /ml	600
0° C	70 ¹		
< 0° C	73		
4° C	60		
4° C	70 ¹		
ambiante	17 à 23		
"	188 à 192		
ambiante	13		
ambiante	38		
< 0° C	29,9		
ambiante	50,4		
< 0° C	46,8		

Tableau XXI : RADIOSENSIBILITE DE DIVERS

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Comer cité par Thornley (329)	S. give S. manhattan S. london S. blockley	oeuf complet " " "	
Babini et Gubetta (29)	S. blockley	sérum physiologi- que	aérobiose
Comer cité par Thornley (329)	S. tenessee S. indiana S. kentucky S. canada S. bareilly	oeuf complet " " " "	
Babini, Gubetta (29)	S. bareilly	sérum physiologi- que	aérobiose
Comer cité par Thornley (329)	S. montevideo S. orianenberg	oeuf complet oeuf complet	
Licciardello et Coll. (219)	S. orianenberg	viande de poulet	
Comer cité par Thornley (329)	S. infantis	oeuf complet	
Dyer et Coll. (117)	S. cholerae suis	bouillon + extrait de levure	aérobiose
Babini et Gubetta (29)	S. cholerae suis	sérum physiologi- que	aérobiose
Ley (212)	S. meleagridis	viande de cheval	
Thieulin et Coll. (326)	S. meleagridis	oeuf complet	aérobiose partielle
Anellis et Coll. (20)	S. javiana S. panama	tampon phosphate "	aérobiose "
Anellis et Coll. (20)	S. infantis 165	tampon phosphate	aérobiose

SEROTYPES DE SALMONELLA

TEMPERATURE	D10 en KRADS	DOSES STERILISANTES	
		Nombre initial de germes	Doses
< 0° C	77	10^7 /g	540
"	76	10^7 /g	530
"	73	10^7 /g	510
"	69	10^7 /g	480
ambiante		10^9 /ml	698
< 0° C	67	10^7 /g	470
"	67	10^7 /g	470
"	60	10^7 /g	420
"	60	10^7 /g	420
"	59	10^7 /g	410
ambiante		10^9 /ml	200
< 0° C	57	10^7 /g	400
< 0° C	56	10^7 /g	390
	70		
< 0° C	56	10^7 /g	390
3 - 5° C	54		
ambiante		10^9 /ml	278
< 0° C	93		
< 0° C		10^5 à 10^6 /g	375
- 80° C		$2,3 \cdot 10^6$ /ml	600
- 80° C		$2,5 \cdot 10^6$ /ml	300
- 80° C		$1,5 \cdot 10^6$ /ml	300

Parmi les 7 sérotypes irradiés par Dyer et Coll. (117), en bouillon, S. para B, wichita et typhi sont dans l'ordre les plus résistantes et S. enteritidis et pullorum les plus sensibles. Mais lorsque les trois premières sont irradiées dans de la chair de crabe, c'est alors S. typhi qui est la plus résistante.

Previtte (270) qui a déterminé la radiosensibilité dans du bouillon coeur-cervelle de 7 souches a trouvé une radiorésistance croissante dans l'ordre pour S. enteritidis, typhimurium S R 11, typhimurium R1 A, newport, heidelberg, thompson.

Enfin, pour Comer (340), dans de l'oeuf congelé S. give, S. manhattan, S. thompson, S. heidelberg, S. london se sont révélées les plus résistantes alors que S. enteritidis et senftenberg sont les plus sensibles.

En conclusion, il semble donc que les S. newport, heidelberg, thompson, typhi, typhimurium, para B sont parmi les plus résistantes alors que S. enteritidis et senftenberg apparaissent les plus sensibles.

Une dose moyenne de 700 Krads permet d'obtenir le plus souvent un facteur d'inactivation égal ou supérieur à 10^6 germes dans des denrées alimentaires.

Cependant, une généralisation est impossible (S. senftenberg est par exemple très résistante dans de la farine de poisson (340)) et l'inactivation des Salmonella doit donc être étudiée pour chaque type de produits.

V.1.2.6. - Radiosensibilité des Pseudomonas

Les résultats figurent dans le tableau XXII (pages 121 - 122)
On constate que les Pseudomonas ont une D10 très basse (2,9 à 4,5 Krads) lorsque l'irradiation a lieu dans un milieu non protecteur en aérobiose. Dans du bouillon, la D10 est légèrement plus élevée (environ 6 Krads). En anaérobiose ou à basse température, les D10 atteignent 17 à 40 Krads. Les D10 en tampon ou en bouillon sont alors peu différentes (Matsuyama et Coll., 231).
Les courbes d'inactivation des Pseudomonas obtenues sont toujours exponentielles.

Tableau XXII : RADIOSENSIBILITE DES

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Koh et Coll. (203)	P. aeruginosa	suspension en eau distillée déposée sur du papier filtre	aérobiose
	P. aeruginosa	"	aérobiose
Thieulin et Coll. (326)	Pseudomonas sp	oeuf complet	anaérobiose partielle
Babini et Gubetta (29)	P. aeruginosa	sérum physiologi- que	aérobiose
Gunter et Kehn (155)	P. fluorescens A.3. 12	tampon phosphate	aérobiose
Thornley (328)	Pseudomonas sp	bouillon	aérobiose
Bridges (51)	Pseudomonas sp	tampon phosphate	aérobiose
	"	"	anaérobiose
Bridges (52)	Pseudomonas sp	tampon phosphate	anaérobiose
Anellis et Coll. (20)	P. aeruginosa QMB 1468	tampon phosphate	aérobiose
Bonet-Maury (43)	P. aeruginosa 414 Lausanne	eau distillée	aérobiose
Matsuyama et Coll. (231)	Pseudomonas sp	tampon phosphate	aérobiose
	"	"	aérobiose
	"	"	anaérobiose
	"	"	anaérobiose
	"	bouillon	aérobiose
	"	"	aérobiose
	"	"	anaérobiose
	"	"	anaérobiose

1 = D10 calculées par Bridges (53)

2 = D10 calculées à partir de la courbe d'inactivation.

PSEUDOMONAS

TEMPERATURE	D 10	DOSES STERILISANTES	
		Nombre initial de germes	Doses
ambiante	2,9 Kreps ¹	$2 \cdot 10^8$ /ml	25 Kreps
ambiante	29 Kreps ¹	$1,2 \cdot 10^8$ /ml	250Kreps
0° C		$8,4 \cdot 10^5$ /g	250 Kreps
ambiante		10^9 /ml	164 Krads
ambiante	3,5 Kroentgens ²		
ambiante	6 Krads		
ambiante	4,5 Krads		
ambiante	19 Krads		
ambiante	17 Krads ²		
- 80° C		$3,2 \cdot 10^6$ /ml	300 Krads
ambiante	3,3 Krads		
ambiante	4,5 Krads		
- 78° C	32 Krads		
ambiante	22 Krads		
- 78° C	41 Krads		
ambiante	6,1 Krads		
- 78° C	28 Krads		
ambiante	23 Krads		
- 78° C	40 Krads		

V.1.2.7. - Achromobacter - alcaligenes

Quelques études sur ces souches ont été réalisées principalement par Thornley et Coll. En 1960, Thornley (327) avait montré que des germes psychrophiles, identifiés comme des *Achromobacter* et qui étaient responsables de l'altération de poulets conservés à + 1° C, semblaient être relativement résistants aux rayons γ . La radiosensibilité de 15 de ces souches fut déterminée (328). Toutes les courbes de survie furent trouvées sigmoïdes, avec des D10 (calculées sur la partie exponentielle) variables selon les souches (10 à 60 Krads).

La radiorésistance fut trouvée être en relation avec la sensibilité à la Pénicilline (2,5 unités), alors que les souches les plus radiosensibles sont résistantes à la Pénicilline.

Anellis et Coll. (20) confirment que *Alcaligenes* irradié à basse température peut être radiorésistant puisque sur les 20 souches de bacilles gram négatif testées, *Alcaligenes faecalis* est le seul à résister à une dose de 0,6 Mrads (irradiation dans du tampon phosphate à basse température).

Par la suite, une étude taxonomique permit de classer ces souches dans le genre *Alcaligenes*. Dans un troisième travail de Thornley et Coll. (231), les variations de radiosensibilité en fonction des conditions d'irradiation d'une souche d'*Alcaligenes* furent étudiées (voir résultats dans le tableau XXIII, pages 124 et 125). Les irradiations furent réalisées en tampon ou en bouillon, à température ambiante ou à - 78° C et en aérobiose ou en anaérobiose. Dans tous les cas les courbes étaient sigmoïdes. La souche étudiée apparaît relativement radiorésistante.

V.1.2.8. - *Acinetobacter* (ex. *Moraxella*, ex. *Bacterium anitratum*).

En 1970, Christensen (74) a rapporté que des souches de *Bacterium anitratum* pouvaient être très radiorésistantes. Les souches avaient été isolées d'échantillons de poussière (échantillons prélevés dans des usines Danoises produisant du matériel médico-chirurgical) avec une fréquence de 1 pour 10³ unités viables.

Les courbes de survie déterminées par irradiation à l'état sec dans des conditions de résistance maximum sont représentées dans la figure n° 14, page 126.

Tableau XXIII : RADIOSENSIBILITE DES

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Thornley (328)	15 souches	bouillon	aérobiose
Matsuyama et Coll. (231)	Alcaligenes MJT/FU/8	tampon phosphate	aérobiose
	"	"	anaérobiose
	"	"	aérobiose
	"	"	anaérobiose
	"	bouillon	aérobiose
	"	"	anaérobiose
	"	"	aérobiose
	"	"	anaérobiose
Anellis et Coll. (20)	Alcaligenes faecalis QMB 1483	tampon phosphate	aérobiose

1 = Le nombre d'extrapolation reflète l'importance de l'épaulement.

(voir pages 33 - 34 - 35)

ACHROMOBACTER - ALCALIGENES

TEMPERATURE D'IRRADIATION	D 10	NOMBRE D'EXTRAPOLA- TION 1	DOSES STERILISANTES	
			Nombre initial de germes	Doses
ambiante	6 à 60 Krads			
ambiante	30 - 31 Krads	40 - 42		
ambiante	100 Krads	8,9		
- 78° C	120 - 130 Krads	4,7 - 6,6		
- 78° C	140 Krads	10		
ambiante	34 Krads	27		
ambiante	80 Krads	28		
- 78° C	130 Krads	8,3		
- 78° C	140 Krads			
- 78° C			$3,2 \cdot 10^6$ /ml	0,9 Mrad

Nombre de survivants
en logarithme

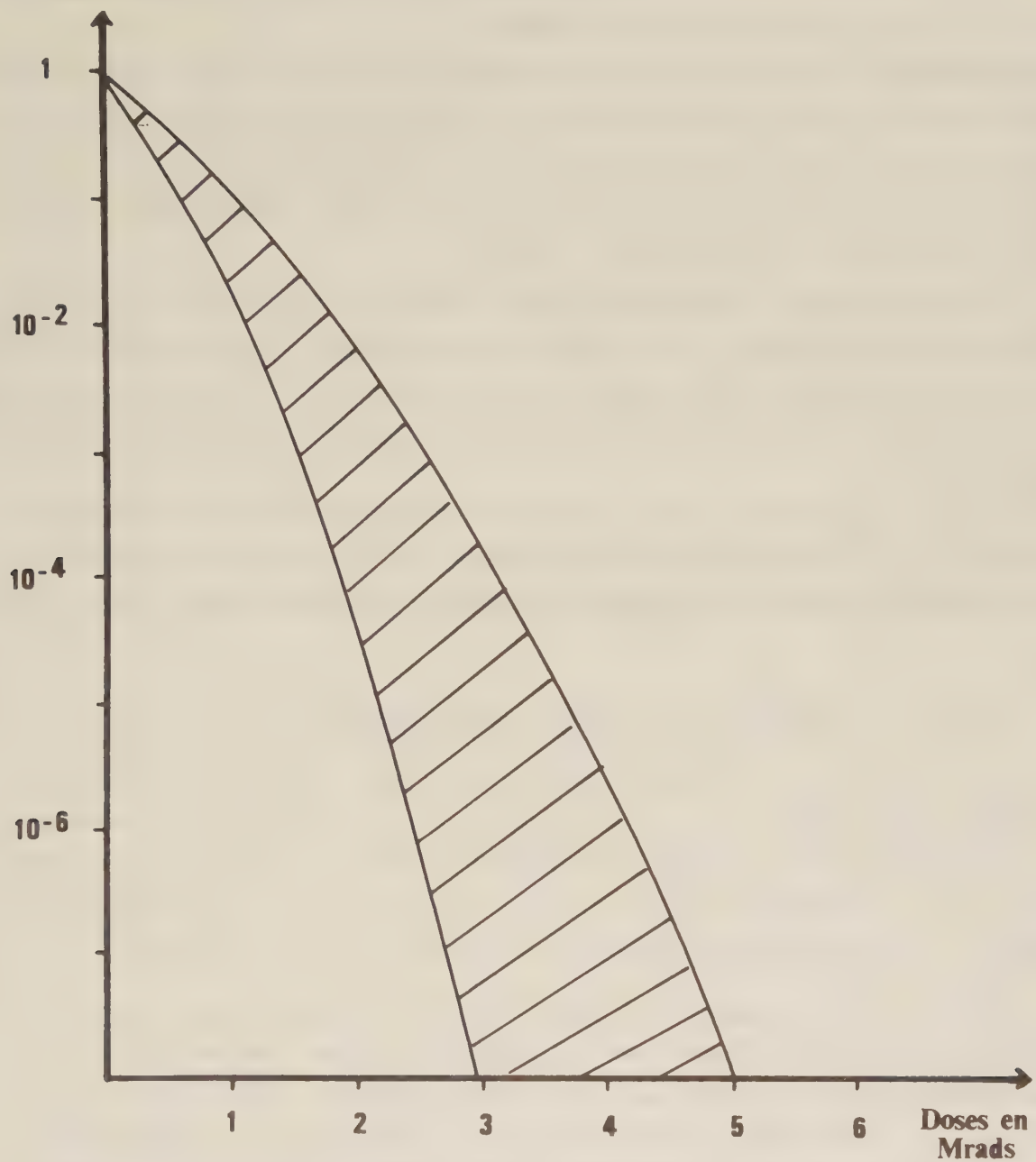


Figure 14 : COURBES D'INACTIVATION DE 14 SOUCHES
D'ACINETOBACTER CALCOACETICUS IRRADIEES
A L'ETAT SEC

D'après CHRISTENSEN (74)

On constate que les doses nécessaires pour avoir une inactivation de 10^8 germes varient de 3 à 5 Mrads.

Christensen (77) pense que ces souches résistantes ont été sélectionnées par les rayons ultra-violets utilisés dans les zones de fabrication du matériel médico-chirurgical. En effet, des souches de laboratoire de la même espèce, étudiées dans les mêmes conditions, ont une radiosensibilité beaucoup plus faible.

En conclusion, les bacilles Gram négatif ont le plus souvent une faible radiorésistance. Les espèces responsables de contaminations hospitalières et résistantes aux antibiotiques comme les *Pseudomonas*, les *Klebsiella*, les *Enterobacter*, les *Serratia*, les *Proteus* sont parmi les plus sensibles.

Cependant, certaines espèces comme les *Achromobacter-alkaligenes* et surtout les *Acinetobacter* se distinguent de l'ensemble du groupe par leur radiorésistance nettement plus forte et parfois même très élevée.

V.1.3. - Bacilles Gram positif non sporulés

Ces espèces ont été peu étudiées. On peut constater d'après le tableau XXIV (pages 128 et 129) que la plupart des souches étudiées sont radiosensibles. Dupuy et Tremeau (116) ont constaté des différences de radiosensibilité entre les 21 souches de *Lacto-bacillus* étudiées, la distribution se faisant selon une courbe de Gauss.

Mais il faut signaler la souche radiorésistante isolée par Christensen (67) d'un échantillon de poussière prélevé dans une usine fabriquant du matériel médico-chirurgical. Cette souche non identifiée précisément, mais qui serait proche des *Corynébactéries*, a une radiorésistance élevée qui augmente avec l'âge de la culture.

Tableau XXIV : RADIOSENSIBILITE DE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Koh et Coll. (203)	Propionibacte- rium acnes E4	suspension en eau distillée déposée sur du papier filtre	aérobiose
	Propionibacte- rium acnes E 36	"	"
Babini et Gubetta (29)	Listeria monocytogenes	sérum physiologique	aérobiose
	Erysipelotrix insidiosa	"	"
Dupuy et Tremeau (116)	21 souches de Lacto-bacillus		
Christensen et Holm (67)	Corynebacterie	suspension en bouillon sérum desséché sur plastique	aérobiose

NP : non précisé

1 : D10 calculée par Bridges (53)

BACILLES GRAM + NON SPORULES

TEMPERATURE	D 10	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
ambiante	29 Kreps ¹	$2,5 \cdot 10^6$	0,2 Mrep
ambiante		NP	0,2 Mrep
ambiante		$1 \cdot 10^9$ /ml	0,25 Mrad
ambiante		$1 \cdot 10^9$ /ml	0,1 Mrad
	5 à 14 Krads		
ambiante		10^6	3,1 à 5 Mrads selon l'âge de la culture

V.1.4. - Bacilles Gram positif sporulés

V.1.4.1. - Bacillus

Très tôt, il est apparu que les spores bactériennes étaient résistantes aux rayons ionisants ; par conséquent un grand nombre d'études sur la radiosensibilité des spores, entre autres de Bacillus, ont été effectuées (voir tableaux XXV à XXXII, pages 133 à 149).

Les courbes de survie sont en général exponentielles pour B. subtilis, B. pumilus, et le plus souvent sigmoïdes avec un épaulement plus ou moins marqué pour B. megaterium, B. stearothermophilus.

Dans la majorité des cas, les D10 des spores de Bacillus sont comprises entre 100 et 300 Krads, mais selon l'espèce testée et les conditions d'irradiation, elles peuvent être inférieures ou supérieures.

Pour une même espèce des différences de sensibilité sont notées entre les résultats des différents expérimentateurs, mais les souches testées ne sont pas toujours les mêmes.

Les modifications de sensibilité en fonction des conditions d'irradiation sont plus difficiles à analyser que dans le cas des bactéries végétatives. En effet, s'il est net que l'irradiation en présence de glucose, de glycérol, d'alcool polyvinylique ou de corps gras, augmente la radiorésistance (62 - 84 - 160), il semble que la dessiccation, les basses températures n'aient pas toujours le même effet.

Ainsi Hill et Phillips (162) notent que la radiosensibilité de spores de B. subtilis est la même lorsque l'irradiation est faite en suspension aqueuse et à l'état sec dans de la Pénicilline lyophilisée. Burt et Ley (62) obtiennent les mêmes D10 pour B. pumilus, qu'il soit irradié en aérobiose dans du tampon phosphate ou desséché sur certains supports. Borick et Coll. (46) montrent que dans certains cas la radiosensibilité est plus élevée à l'état sec qu'en présence d'eau. B. pumilus irradié à 10 - 13° C ou à - 79° C a pratiquement la même D10 (Matsuyama et Coll. 133).

Mais, il faut préciser que les méthodes de préparation des spores influencent leur radiorésistance. Christensen (67) a remarqué que la radiosensibilité pouvait varier d'une préparation à l'autre malgré les

efforts faits pour maintenir les conditions de préparation uniformes. Dans un second travail, Christensen et Sehested (69) ont montré qu'un lavage dans un milieu tamponné avant dessiccation diminue la résistance. Par contre, le chauffage pour éliminer les formes végétatives ne semble pas avoir d'influence.

Yamazaki (357) a observé que le milieu de culture pour la production des spores pouvait avoir une influence. En effet, les spores obtenues par culture sur tryptone ou agar nutritif glucosé ou agar nutritif plus extrait de levure, n'ont pas toujours la même radiorésistance. L'influence des milieux varie avec les espèces, si bien qu'il est impossible de dire que tel milieu donne dans tous les cas des spores de résistance maxima.

Il est donc difficile de comparer les radiosensibilités en fonction des espèces et d'affirmer qu'il existe des différences très marquées, sauf exception comme pour B. sphaericus. Cependant, l'étude de Pepper et Coll. (250) sur 25 souches de bactéries sporulées a attiré l'attention sur B. pumilus qui se révélait être un des plus résistants (résistance comparable à celle de Clostridium tetani).

Les travaux postérieurs de Darmady et Coll. (96) ont confirmé ces résultats ; parmi les 6 sporulés testés dont Clostridium welchii et Clostridium tetani, B. pumilus E 601 était le plus radiorésistant. Dans ce travail, les spores de Bacillus stearothermophilus (souche utilisée pour les contrôles de stérilisation par la chaleur) étaient plus radiosensibles que B. pumilus E 601.

Ces résultats ont donc conduit les auteurs Anglais à utiliser B. pumilus E 601 comme germe test pour la radiostérilisation.

Comme nous le verrons plus loin, le code d'utilisation de la radiostérilisation (code of practice) proposé en 1967 par l'Agence Internationale pour l'Energie Atomique (I.A.E.A.) a également retenu B. pumilus E 601 comme germe test.

En fait, si l'on examine l'ensemble des résultats des différents auteurs, B. pumilus n'apparaît pas plus résistant que certaines souches d'autres espèces. Ainsi Christensen (67) remarquait en 1964 que B. pumilus E 601, B. subtilis et B. globigii, irradiés dans les

mêmes conditions avaient des D10 voisines. Briggs et Yazdany (56) et Yamazaki (357) dans son étude sur 38 souches de Bacillus observent une radiorésistance plus élevée pour d'autres espèces (B. stearothermophilus pour les premiers ; B. megaterium, cereus, anthracis pour le second).

Enfin, il est nécessaire d'examiner à part la radiosensibilité des spores de Bacillus sphaericus et particulièrement B. sphaericus C₁A. Les souches étudiées par Yamazaki (357) ne semblent pas avoir une radiorésistance plus élevée que celle d'autres Bacillus.

Cependant, en 1970, Christensen (74) a rapporté l'isolement à partir de prélèvements de poussière, de souches de Bacillus sphaericus possédant une radiorésistance importante.

Ces souches isolées avec une fréquence faible (inférieure à 1 pour 10⁴ germes) avaient des D10 comprises entre 0,35 et 0,5 Mrad (Christensen, 78).

L'auteur recherchait une souche sporulée possédant une radiorésistance aussi élevée que celle de Streptococcus faecium A₂1, afin de l'utiliser comme germe test pour le contrôle de la radiostérilisation. En effet, l'utilisation de S. faecium A₂1 posait des problèmes, en raison de la conservation limitée des indicateurs préparés avec cette souche (78). Par une méthode d'irradiations répétées, Christensen et ses collaborateurs ont pu sélectionner un clone de B. sphaericus plus radiorésistant et stable. Ce mutant, appelé B. sphaericus C₁A a une D10 de 0,8 à 1 Mrad, et la reproductibilité d'un lot à l'autre est très bonne. Par la suite, B. sphaericus C₁A a donc été utilisé avec l'appui de l'I.A.E.A. comme germe test.

De même, Christensen (78) a pu sélectionner des mutants radio-résistants par irradiations répétées d'une souche de Bacillus cereus. Ces mutants permettent de préparer des indicateurs biologiques pour des contrôles de stérilité.

Tableau XXV : RADIOSENSIBILITE DES SPORES

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Pepper et Coll. (250)	E ₉₃	suspension en eau distillée, déposée sur du papier filtre	aérobiose
	E ₂	"	"
	E ₉₂	"	"
Darmady et Coll. (96)	NMH	suspensions en eau distillée dessé- chées sur du papier filtre	aérobiose
Hills et Phillips (162)	NCTC 2116	suspension en eau distillée	aérobiose
	NCTC 2116	Pénicilline lyophi- lisée	anaérobiose
Cook et Roberts (84)	NCTC 8236	suspension en eau distillée	aérobiose
	"	suspension dans une solution à 5 % de glucose	aérobiose
	"	suspension en eau distillée lyophi- lisée	anaérobiose
	"	suspension à 5% de glucose lyophilisée	anaérobiose
Christensen et Holm (67)	souche test pour la stérilisation par la chaleur sèche	suspension en bouillon sérum desséchée sur polyéthylène	aérobiose
Briggs (55)	NCTC 8236	Suspension en eau distillée	aérobiose
Borick et Fogarty (46)	E 152	suspensions en eau distillée	aérobiose
	E 163	"	"

DE BACILLUS SUBTILIS

TEMPERATURE	D 10	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
ambiante	250 Kreps ¹	$5 \cdot 10^5$ /ml	1,6 Mreps
"	240 Kreps ¹	$5 \cdot 10^5$ /ml	1,6 Mreps
"	190 Kreps ¹	$5 \cdot 10^5$ /ml	1,2 Mreps
ambiante	170 Kreps ¹	$8,1 \cdot 10^6$ /disque	1,5 Mrads
ambiante	202 Krads		
ambiante	200 Krads		
ambiante	66 Krads		
ambiante	100 Krads		
ambiante	500 Krads		
ambiante	500 Krads		
ambiante	250 à 325 Krads selon les pré- parations.		
ambiante	220 Krads		
ambiante	146 Krads		
ambiante	114 Krads		

Tableau XXV (suite) : RADIOSENSIBILITE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Briggs et Yazdany (56)	NCIB 3610	suspension en eau distillée	aérobiose
	variété niger NCIB 8649	"	"
Yamazaki (357)	n° 3	tampon phosphate	aérobiose
	n° 50	"	"
	n° 95	"	"
	PCI 219	"	"
Härnult et Snygg (160)	NCIB 8054	eau distillée	aérobiose
	"	tampon phosphate	"
	"	solution à 15,3 % de glucose	"
	"	solution à 26,5 % de glucose	"
	"	solution à 15,6 % de glycérol	"
	"	solution à 31,5 % de glycérol	"
	"	solution à 47,9 % de glycérol	"
	"	solution à 64,8 % de glycérol	"
	"	solution à 88 % de glycérol	"
	"	solution à 100 % de glycérol	"

1 = Variation des D10 en fonction du milieu de culture utilisé pour les

DES SPORES DE BACILLUS SUBTILIS

TEMPERATURE	D 10	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
ambiante	290 Krads		
"	230 Krads		
ambiante	170 à 240 Krads ¹		
"	100 à 240 Krads ¹		
"	170 à 240 Krads ¹		
"	190 à 230 Krads ¹		
ambiante	230 Krads		
"	240 Krads		
"	270 Krads		
"	290 Krads		
"	280 Krads		
"	330 Krads		
"	340 Krads		
"	350 Krads		
"	380 Krads		
"	420 Krads		

numérations.

Tableau XXVI : RADIOSENSIBILITE DES SPORES DE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Pepper et Coll. (250)	E 95	Suspension en eau distillée déposée sur des disques de papier filtre	aérobiose
	E 601	"	"
Darmady et Coll. (96)	E 601	Suspension en eau distillée desséchée sur des disques de papier filtre	aérobiose
Matsuyama et Coll. (232)	E 601	tampon phosphate	aérobiose
	"	"	"
	"	bouillon (infusion de coeur)	aérobiose
Christensen et Holm (67)	E 601	Suspension en bouil- lon sérum desséchée sur feuille de plastique	aérobiose
Borick et Fogarty (46)	E 601	suspension en eau distillée	aérobiose
	E 601 X	"	"
Briggs et Yazdany (56)	NCIB 9369	eau distillée	aérobiose
Yamazaki (357)	240	tampon phosphate	aérobiose
	247	"	"
	E 601	"	"

1 = D10 calculées par Bridges (53)

2 = D10 non calculées par l'auteur, mais déterminée sur la courbe

BACILLUS PUMILUS

TEMPERATURE	D 10	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
ambiante	330 Kreps ¹	$5 \cdot 10^5$ /disque	2,1 Mreps
"	300 Kreps ¹	$5 \cdot 10^5$ /disque	1,9 Mreps
ambiante	260 Krads ¹	$5 \cdot 10^7$ /disque	2,5 Mrads
+10 à +13° C	148 à 231 Krads		
- 79° C	172 à 186 Krads		
- 79° C	172 Krads		
ambiante	260 Krads ²		
ambiante	171 Krads		
"	175 Krads		
ambiante	320 Krads		
ambiante	210 à 230 Krads		
"	220 à 315 Krads		
"	215 à 290 Krads		

d'inactivation.

Tableau XXVII : RADIOSENSIBILITE DES SPORES DE B. PUMILUS E 601 (SUSPENSION DANS DIFFERENTS MILIEUX DESSECHES SUR DES SUPPORTS VARIABLES

D'après BURT et LEY (62)

MILIEU DE SUSPENSION	SUPPORTS	ATMOSPHERE	TEMPERATURE	D10 en Krads
tampon phosphate	néant	aérobiose	ambiante	175
tampon phosphate	néant	anaérobiose	"	306
tampon phosphate	verre	aérobiose	ambiante	169
bouillon	verre	"	"	156
sérum	verre	"	"	153
Alcool polyvinylique	verre	"	"	282
Corps gras	verre	"	"	342
tampon phosphate	"perspex"	"	"	159
bouillon	"perspex"	"	"	151
tampon phosphate	feuille d'aluminium	"	"	178
bouillon	"	"	"	144
sérum	"	"	"	154
alcool polyvinylique	"	"	"	283
Tampon phosphate	polystyrène	"	"	178
tampon phosphate	acier inoxydable	"	"	155
tampon	film d'alcool polyvinylique	"	"	211
Bouillon	"	"	"	324
sérum	"	"	"	329
alcool polyvinylique	"	"	"	363

Tableau XXVIII : RADIOSENSIBILITE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
De Saint-Aubert et Coll. (285)	NP	jambon haché en conserves	anaérobiose partielle
Briggs (55)	NCTC 5893	eau distillée	aérobiose
Borick et Fogarty (46)	NP	suspension en eau distillée	aérobiose
Yamazaki (357)	IAM 1029	tampon phosphate	aérobiose
	BTV	"	"
	BJA	"	"
	370	"	"
	608	"	"
Christensen (78)	NCTC 2603	suspension en bouil- lon sérum desséchée sur des feuilles de plastique	aérobiose
	mutants radio- résistants de la souche pré- cédente sélectionnés par irradiations répétées.	"	"

NP = non précisé

DE BACILLUS CEREUS

TEMPERATURE D'IRRADIATION	D10 en KRADS	EPAULEMENT D q	DOSES STERILISANTES MINIMA	
			Nombre initial de germes	Doses en Mrads
10° C			10^3 à 10^4	2
ambiante	160	200 Krads		
ambiante	107	+ NP		
ambiante	225 à 250	+ NP		
"	230 à 300	+		
"	320	+		
"	190 à 220	+		
"	280 à 300	+		
ambiante	218	0		
ambiante		+	10^8 /échantillon	2,5 à 6,25

Tableau XXIX : RADIOSENSIBILITE DE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION
Woese (353)	NP	eau distillée
Powers (267)	NP	milieu aqueux
		"
		spores deshydratées
		"
Briggs (55)	NCTC 7581	eau distillée
Yamazaki (357)	IAM 1166	tampon phosphate
	368	"
	371	"
	372	"

1 = D10 non citées par les auteurs, mais calculées à partir des
NP = non précisé

BACILLUS MEGATERIUM

ATMOSPHERE	TEMPERATURE	D 10	EPAULEMENT
NP	NP	145 KR ¹	+
aérobiose	ambiante	80 Krads ¹	0
anaérobiose	"	125 Krads ¹	0
aérobiose	"	22 Krads ¹	0
anaérobiose	"	34 Krads ¹	0
aérobiose	ambiante	120 Krads	600 Krads
aérobiose	ambiante	210 à 340 Krads	+
"	"	200 à 320 Krads	+
"	"	180 à 210 Krads	+
"	"	310 à 420 Krads	+

courbes d'inactivation.

Tableau XXX : RADIOSENSIBILITE DE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Briggs (55)	NCIB 8919	eau distillée	aérobiose
Darmady et Coll. (96)	8157	suspension en eau distillée desséchée sur disques de papier	aérobiose
Briggs et Yazdany (56)	NCIB 8919	eau distillée	aérobiose
Härnult et Snygg (160)	ATCC 7953	eau distillée	aérobiose
	"	tampon phosphate	"
	"	suspension dans so- lution à 15,3 % de glucose	"
	"	suspension dans so- lution à 25,5 % de glucose	"
	"	suspension dans so- lution à 15,6 % de glycérol	"
	"	glycérol 31,5 %	"
	"	glycérol 47,9 %	"
	"	glycérol 64,8 %	"
	"	glycérol 88 %	"
	"	glycérol 100 %	"

B. STEAROTHERMOPHILUS

TEMPERATURE	D10 en KRADS	EPAULEMENT	DOSES STERILISANTES MINIMA	
			Nombre initial de germes	Doses en Mrads
ambiante	220	500 Krads		
ambiante	210		1,6 10^5	1,5 Mrads
ambiante	460	250 Krads		
ambiante		+	10^4	1,9 Mrads
"		+	10^4	1,7
"		+	10^4	2,2
"		+	10^4	2,2
"		+	10^4	2,6
"		+	10^4	2,6
"		+	10^4	2,5
"		+	10^4	2,5
"		+	10^4	2,8
"		+	10^4	3

Tableau XXXI : RADIOSENSIBILITE DE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Darmady et Coll. (96)	B. globigii	suspension en eau distillée desséchée sur papier filtre	aérobiose
Christensen et Holm (67)	B. globigii ATCC 9372	suspension en bouil- lon sérum desséchée sur plastique	aérobiose
Borick et Fogarty (46)	B. globigii E 154	eau distillée	aérobiose
Pepper et Coll. (250)	B. mesentericus E 40	suspension en eau distillée déposée sur du papier filtre	aérobiose
Woese (353)	B. mesentericus	eau distillée	-
Borick et Fogarty (46)	B. mesentericus E 40	eau distillée	aérobiose
Pepper et Coll. (250)	B. coagularis E 85	suspension en eau distillée desséchée sur papier filtre	aérobiose
	B. coagularis E 553 A	"	aérobiose
Yamazaki (357)	B. coagularis O 564	tampon phosphate	aérobiose
	B. coagularis akiba-b	"	"
	B. coagularis yamanakac	"	"

1 = D10 non citées par les auteurs, mais calculées à partir des courbes

2 = D10 calculée par Bridges (53)

SPORES DE BACILLUS DIVERS

TEMPERATURE	D 10	EPAULEMENT	DOSES STERILISANTES MINIMA	
			Nombre initial de germes	Doses
ambiante		$< 130 \text{ Krads}^2$	$1,7 \cdot 10^6$	1 Mrad
ambiante	300 Krads^1	0		
ambiante	165 Krads	+		
ambiante	290 Kreps^2		$5 \cdot 10^5$	1,8 Mrep
-	140 Krads^1			
ambiante	118 Krads			
ambiante	190 Kreps		$5 \cdot 10^5$	1,2 Mrep
ambiante	160 Kreps		$5 \cdot 10^5$	1 Mrep
ambiante	275 à 375 Krads			
"	240 à 270 Krads			
"	220 à 310 Krads			

de survie.

Tableau XXXII : RADIOSENSIBILITE DE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION
Christensen (74)	B. sphaericus isolé d'échantillons de poussière	suspensions en bouil- lon desséchées sur des feuilles de plastique
Christensen (78)	B. sphaericus C ₁ A	suspensions en bouil- lon desséchées sur des feuilles de plastique
Yamazaki (357)	B. sphaericus 548 B. sphaericus 552	tampon phosphate "
Ley et Coll. (214)	B. sphaericus C ₁ A ₁	tampon phosphate

1 = D10 non citées par les auteurs, mais calculées à partir des

BACILLUS SPHAERICUS

ATMOSPHERE	TEMPERATURE	D10 en KRADS
aérobiose	ambiante	300 à 900 ¹
		900 ¹
aérobiose	ambiante	240
"	"	140 à 270
aérobiose	ambiante	500 ¹

courbes d'inactivation.

V.1.4.2. - Bacilles Gram positif sporulés anaérobies

Les résultats des tableaux XXXIII à XXXVII (pages 151 à 162) montrent que dans l'ensemble l'échelle des radiosensibilités est superposable à celle des spores de *Bacillus*.

Là aussi, entre les souches d'une même espèce, des différences importantes de radiosensibilité sont notées. Par exemple, les D10 obtenues par Pleceas et Coll. (253) paraissent particulièrement élevées en comparaison avec les autres résultats.

Clostridium botulinum est particulièrement radiorésistant surtout lorsqu'il est irradié dans des denrées alimentaires et à basse température. Il existe des différences de sensibilité entre les types, le type A étant le plus résistant (Anellis et Coll., 17 - 19).

De même, les différents types de *Clostridium welchii* n'ont pas la même sensibilité. Roberts (282) a montré que les souches responsables d'intoxications alimentaires sont plus résistantes.

Tableau XXXIII : RADIOSENSIBILITE DE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Roberts (282)	NCTC 3181 type C	eau distillée	aérobiose
	NCTC 8084 type E	"	"
	NCTC 8503 type D	"	"
	NCTC 8238	"	"
	Souches respon- sables d'intoxi- cations alimen- taires :		
	NCTC 8797	"	"
	NCTC 8797	"	"
Matsuyama et Coll. (232)	F 2985/ 50	bouillon de Robert- son	anaérobiose
	"	"	"
Midura et Coll. (232 bis)	type A G 47	tampon phosphate	aérobiose
	type A E ₂	tampon phosphate	aérobiose
	type A E ₂	bouillon	-
Pleceas et Coll. (253)	type A BP ₆ K	suspension en solu- tion saline	aérobiose
Darmady et Coll. (96)	8797	suspension en bouil- lon desséchée sur papier filtre	aérobiose
Roberts et Coll. (281)	type A	eau distillée	aérobiose
	type B	"	"
	type C	"	"
	type E	"	"
	type F	"	"

1 = D10 calculée par Bridges (53)

a = spores non soumises à un choc thermique qui favorise la germination

b = spores soumises à un choc thermique 85°, 10 mn avant irradiation

c = spores soumises à un choc thermique 85°, 10 mn après irradiation.

CLOSTRIDIUM WELCHII

TEMPERATURE	D10 en Mrads	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
ambiante	0,18 à 0,21		
"	0,12 à 0,14		
"	0,18		
"	0,26		
ambiante	0,29		
"	0,26 à 0,34		
ambiante	0,213 à 0,245 ^a , 0,485 ^b , 0,336 ^c		
- 79° C	0,213 à 0,245 ^a , 0,430 ^b , 0,336 ^c		
0° C	0,25		
0° C	0,23		
-	0,30		
0° C	0,25		
ambiante	0,270 ¹	2,3. 10 ⁵ /disque	2 Mrads
ambiante	0,12		
"	0,17		
"	0,18		
"	0,12		
"	0,20		

Tableau XXXIV : RADIOSENSIBILITE DES

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Pepper et Coll. (250)	P. tetani E ₃	suspension en eau distillée déposée sur des disques de papier filtre	aérobiose
	P. tetani E ₈₆	"	"
Borick et Fogarty (46)	P. tetani E ₃	suspension en eau distillée	aérobiose
Pleceas et Coll. (253)	P. tetani 21 D	suspension dans une solution sali- ne	aérobiose
Darmady et Coll. (96)	P. tetani 5411	suspension en bouillon dessé- chée sur papier filtre	aérobiose
Roberts et Coll. (281)	P. tetani	eau distillée	aérobiose

1 = D10 calculée par Bridges (53)

2 = D10 non citée par l'auteur, mais calculée à partir de la courbe

SPORES DE PLECTRIDIDIUM TETANI

TEMPERATURE	D 10	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
ambiante	0,330 Mreps ¹	5. 10 ⁴ /disque	2,1 Mreps
"	0,220 Mreps	5. 10 ⁴ /disque	1,4 Mreps
ambiante	0,177 Mreps		
ambiante	0,570 Mreps ²		
ambiante	0,130 Mrads ¹	5,2. 10 ⁵ /disque	1 Mrad
ambiante	0,240 Mreps		

d'inactivation

Tableau XXXV : RADIOSENSIBILITE DE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Pepper et Coll. (250)	E 58	suspension en eau distillée déposée sur papier filtre	aérobiose
	E 44	"	"
Borick et Fogarty (46)	E 123	suspension en eau distillée	aérobiose
	E 153	"	"
Fuld et Coll. (136)	PA # 76 H	suspension en sérum physiologique	aérobiose
Roberts et Coll. (281)	NCTC 532	suspension en eau distillée	aérobiose
	PA 3679/S2	"	"
Pleceas et Coll. (253)	Souche isolée d'un prélève- ment de sol	suspension en sérum physiologique	aérobiose

1 = D10 calculées par Bridges (53)

CLOSTRIDIUM SPOROGENES

TEMPERATURE	D 10	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
ambiante	0,27 Mreps ¹	5. 10 ⁴ /disque	1,7 Mrads
"	0,22 Mreps ¹	5. 10 ⁴ /disque	1,4 Mrads
ambiante	0,106 Mrads		
"	0,091 Mrads		
ambiante	0,325 Mrads		
ambiante	0,16 Mrads		
ambiante	0,22 Mrads		
ambiante	0,64 Mrads		

Tableau XXXVI : RADIOSENSIBILITE DE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Pepper et Coll. (250)	Cl.aerofoetidum E 53	suspension en eau distillée déposée sur papier filtre	aérobiose
	Cl. novyi E 42	"	"
De Saint-Aubert et Coll. (285)	Cl.bifermentans	jambon précuit en conserves	anaérobiose partielle
Pleceas et Coll. (253)	Cl. septicum	suspension en sérum physiologique	aérobiose
	Cl.histoliticum	"	"

1 = D10 calculées par Bridges (53)

CLOSTRIDIUM DIVERS

TEMPERATURE	D10 en KRADS	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
ambiante	0,25 ¹	5.10 ⁴ /disque	1,6 Mrad
"	0,22 ¹	5.10 ⁴ /disque	1,4 Mrad
10° C		10 ⁴ à 10 ⁵ /g	2 Mrads
ambiante	0,680		
"	0,710		

Tableau XXXVII : RADIOSENSIBILITE DES SPORES

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Morgan et Reed (219)	62 A	tampon phosphate	aérobiose
Schmidt et Nank (288)	Mélange type A et type B	morceaux de poulet	anaérobiose
	"	viande de boeuf	"
	"	viande de porc	"
	"	haricots verts	"
Erdman et Coll. (124)	C.botulinum A	bouillon	aérobiose
	C.botulinum E toxigène	"	"
	C.botulinum E non toxigène	"	"
Erdman et Coll. (125)	C.botulinum A	bouillon	aérobiose
Anellis et Coll. (15)	type 33 A	tampon phosphate	aérobiose
	"	bouillon (infusion de porc et pois)	anaérobiose
Roberts et Ingram (281)	type A NCTC 7272	eau distillée	aérobiose
	type A 1192 Y	"	"
	type B 213	"	"
	type D	"	"
	type E beluga	"	"
	type E 16/63	"	"
	type F	"	"

1 = D10 calculées à partir des courbes d'inactivation.

DE CLOSTRIDIUM BOTULINUM

TEMPERATURE	D 10	EPAULEMENT
ambiante	0,255 Mrep ¹	0,400 Mrep ¹
ambiante	0,30 à 0,35 Mrad	
"	0,30 à 0,34 Mrad	
"	0,27 à 0,31 Mrad	
"	0,18 à 0,19 Mrad	
ambiante	0,235 Mrep ¹	0
"	0,170 Mrep ¹	0
"	0,210 Mrep ¹	0
ambiante	0,270 Mrep ¹	0
ambiante	0,295 Mrad	+
"	0,396 Mrad	+
ambiante	0,120 Mrad	0,9 - 1 Mrad
"	0,14 Mrad	0,9 - 1 Mrad
"	0,11 Mrad	0,9 - 1 Mrad
"	0,22 Mrad	0,25 à 0,35 Mrad
"	0,08 Mrad	0,25 à 0,35 Mrad
"	0,16 Mrad	0,25 à 0,35 Mrad
"	0,25 Mrad	0,25 à 0,35 Mrad

Tableau XXXVII (suite) : RADIOSENSIBILITE DE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION
Grecz et Coll. (153)	Cl. botulinum 33 A	tampon phosphate
	"	"
	"	boeuf haché
	"	"
Anellis et Coll. (17)	Cl. botulinum 33 A	jambon cuit en con- serve
	" 36 A	"
	" 62 A	"
	" 77 A	"
	" 12885 A	"
	" 9 B	"
	" 40 B	"
	" 41 B	"
	" 51 B	"
	" 53 B	"
Anellis et Coll. (19)	Cl. botulinum 33 A	viande de porc en conserves
	" 36 A	"
	" 62 A	"
	" 77 A	"
	" 12885 A	"
	" 9 B	"
	" 40 B	"
	" 41 B	"
	" 51 B	"
	" 53 B	"

CL. BOTULINUM

ATMOSPHERE	TEMPERATURE	D10 en MRADS
anaérobiose	0° C	0,290
"	- 196° C	0,396
"	0° C	0,463
"	- 196° C	0,680
anaérobiose	5° C	0,235
"	"	0,218
"	"	0,214
"	"	0,240
"	"	0,242
"	"	0,171
"	"	0,143
"	"	0,175
"	"	0,166
"	"	0,164
anaérobiose	5 à 25° C	0,358
"	"	0,313
"	"	0,361
"	"	0,331
"	"	0,299
"	"	0,334
"	"	0,299
"	"	0,316
"	"	0,159
"	"	0,339

V.1.5. - Mycobactéries (voir tableau XXXVIII, pages 164, 165)

Les Mycobactéries ont une faible radiorésistance puisque les D10 varient de 25 à 46 Krads, lorsque les souches sont irradiées en milieu liquide. Après lyophilisation, la résistance augmente (D10 = 128 Kd), comme l'ont montré Ghys et Coll. (140).

V.2. - Levures et Champignons

V.2.1. - Levures

Les levures semblent avoir été assez peu étudiées, sauf Saccharomyces cerevisiae qui a été utilisé comme modèle pour des études radiobiologiques fines.

Chez les levures, les cellules diploïdes sont plus radiorésistantes que les cellules haploïdes et leurs courbes d'inactivation sont sigmoïdes (253 - 155 - 194 - 196). Il semble que la plus grande résistance des cellules diploïdes soit due à l'existence de deux "noyaux". Cependant quand le degré de ploïdie augmente au delà de 2, il y a une augmentation de la sensibilité (196).

Quelques résultats de radiosensibilité des saccharomyces figurent dans le tableau XXXIX (pages 167 - 168). Saccharomyces cerevisiae semble très sensible aux radiations ionisantes. Cependant les résultats de Bridges et Coll. (48) sont discordants, la dose inactivante minima trouvée étant très élevée. Mais aucune précision n'est donnée sur la ploïdie de la souche testée et sur le nombre de cellules dans l'échantillon irradié.

Les auteurs ont également étudié d'autres levures. Toutes les souches ont une radiorésistance élevée, qui est, pour certaines, presque équivalente à celle des spores bactériennes.

Les levures du genre Candida sont apparues les plus résistantes et particulièrement Candida parakrusei. Paradoxalement, bien que ce travail ait été publié en 1956, il semble qu'aucune étude approfondie sur la radiosensibilité des levures n'ait été pratiquée depuis.

Tableau XXXVIII : RADIOSENSIBILITE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Dyer et Coll. (117)	M. smegmatis	bouillon	aérobiose
Erdman et Coll. (124)	M. tuberculosis BCG	bouillon	aérobiose
Borick et Fogarty (46)	M. tuberculosis	suspension en bouillon déposée sur des disques de papier filtre	aérobiose
	"	suspension dessé- chée sur disques de papier filtre	aérobiose
Ghys et Coll. (140)	BCG 568-51	milieu de Sauton	aérobiose
	"	suspension lyo- philisée	anaérobiose

1 = D10 non citées par les auteurs, mais calculées à partir des courbes

DES MYCOBACTERIES

TEMPERATURE	D10 en KRADS	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses en Krad
ambiante	41 ¹		
ambiante	25 ¹		
ambiante		5. 10 ⁵ /disque	70 à 90
ambiante		5. 10 ⁵ /disque	130 à 170
ambiante	46		
ambiante	128		

de survie.

Pourtant quelques travaux isolés paraissent confirmer que certaines levures sont radiorésistantes (tableau XXXX, pages 169 - 170) Thornley et Coll. (327), lors d'une étude sur l'effet de l'irradiation sur la conservation des aliments, en l'occurrence de poulet, ont montré que les levures pouvaient être résistantes. En effet, alors que la flore initiale était composée essentiellement de *Pseudomonas* et d'*Achromobacter*, après 0,5 Mrad les seuls microorganismes isolés étaient des levures. Ces levures n'ont pas été identifiées. Plus récemment, Ley et Coll. (214) ont isolé sur des seringues à usage unique irradiées à des doses inférieures à 2,5 Mrads, une souche de levure particulièrement résistante. Cette souche de *Pullularia pullulans* était plus résistante que *Streptococcus faecium* irradié dans les mêmes conditions (tampon phosphate). La courbe de survie obtenue était sigmoïde.

Enfin, Österberg (246) a étudié la flore contaminant des sutures chirurgicales et parmi les 12 souches les plus radiorésistantes, 2 étaient des levures. Une de ces souches pigmentée en rouge avait une courbe de survie faite de deux exponentielles, la première ayant la pente la plus faible ($D_{10} = 700$ Krads et 190 Krads environ), la seconde souche non pigmentée avait une courbe de survie exponentielle avec une D_{10} de 600 Krads.

V.2.2. Radiosensibilité des Champignons (tableaux XXXXI et XXXXII, (pages 171 à 174)).

En 1956, Bridges et Coll. (48) parallèlement aux levures ont également étudié la radiosensibilité de certains *Aspergillus* et *Penicillium*. Toutes les souches testées se sont révélées plus radiosensibles (doses inactivantes de 140 à 380 Krads) que les levures.

Sommer (304) a fait en 1973 une revue de la littérature sur les effets des radiations ionisantes sur les champignons. La plupart des travaux ont été faits sur des spores asexuées, qui sont les seules formes pour lesquelles des courbes de survie puissent être obtenues. Les courbes de survie sont en général sigmoïdes avec un épaulement plus ou moins important, suivi par une courbe exponentielle. En général, les différences de sensibilité observées entre les différentes souches sont plus en relation avec une variation de la grandeur de l'épaulement, qu'avec une variation de la pente (les écarts de D_{10} sont donc peu importants). Les champignons ne sont pas très radiorésistants. Aucun champignon étudié à ce jour, n'a une résistance aussi élevée que celle des spores bactériennes.

Tableau XXXIX : RADIOSENSIBILITE DES

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Gunter et Kohn (155)	<i>S. cerevisiae</i> haploïde 93 1C	tampon phosphate	aérobiose
Wood (354)	<i>S. cerevisiae</i> 93 1C	tampon phosphate	aérobiose
Kaplan et Moses (194)	<i>S. cerevisiae</i> haploïde <i>S. cerevisiae</i> diploïde	} Etat sec	
Averbeck et Ebert (28)	<i>S. cerevisiae</i> diploïde, souche sauvage "	tampon phosphate "	aérobiose "
Bridges et Coll. (48)	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. ellipsoïdus</i> <i>S. fragilis</i>	suspension en eau distillée déposée sur disque de papier filtre " "	aérobiose " "

NP = non précisé

SACCHAROMYCES

TEMPERATURE	D10	D37 en KRADS	DOSES STERILISANTES MINIMA	
			Nombre initial de germes	Doses en Kreps
ambiante	6 Kroent- gen			
ambiante	6 Kroent- gen			
		2,8 à 3,7 7 à 13		
ambiante		19,6	NP	900
"		52,6		
ambiante			NP	900
"			NP	700
"			NP	900

Tableau XXXX : RADIOSENSIBILITE DE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Bridges et Coll. (48)	Candida albicans	suspension en eau distillée déposée sur disques de papier filtre	aérobiose
	Candida krusei	"	"
	Candida parakrusei	"	"
	Candida mortifera	"	"
	Cryptococcus neoformans	"	"
	Torula cremoius	"	"
	Torula histolytica	"	"
	Torula rosei	"	"
Ley et Coll. (214)	Pullularia pullulans	tampon phosphate	aérobiose
Österberg (246)	levure non identifiée (pigment rouge)	suspension en bouillon, dessé- chée sur plasti- que	aérobiose
	levure non iden- tifiée (non pigmentée)	"	"

NP = non précisé

1 = Courbe composite, les D10 sont calculées sur les 2 portions de

DIFFERENTES ESPECES DE LEVURES

TEMPERATURE	D 10	DOSES STERILISANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
ambiante		NP	1 Mrep
"		NP	1,15 Mrep
"		NP	1,9 Mrep
"		NP	0,6 Mrep
"		NP	0,9 Mrep
"		NP	0,5 Mrep
"		NP	1 Mrep
"		NP	0,5 Mrep
ambiante		10^4 /ml	1,1 Mrad
ambiante	0,7 Mrad ; ¹ 0,19 Mrad		
"	0,6 Mrad		

la courbe.

Tableau XXXXI : RADIOSENSIBILITE DES

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION
Bridges et Coll. (48)	Aspergillus niger mycelium + spores	suspension en eau distillée déposée sur papier filtre
	Aspergillus niger spores	"
	Aspergillus versicolor (mycelium + spores)	"
	Aspergillus versicolor spores	"
	Aspergillus fumigatus (mycelium + spores)	"
	Aspergillus fumigatus spores	"
	Aspergillus flavus spores	"
	Aspergillus oryzae spores	"
	Aspergillus fischeri spores	"
	Aspergillus terreus spores	"
	Aspergillus glaucus (mycelium + spores)	"
Bridges et Coll. (48)	Penicillium camemberti (culture totale)	suspension en eau distillée déposée sur papier filtre
	Penicillium notatum (culture totale)	"
Chou et Coll. (66)	Penicillium expansum spores	eau distillée
Sommer (304)	Penicillium expansum spores	eau distillée

ASPERGILLUS et PENICILLIUM

ATMOSPHERE	TEMPERATURE	DOSES INACTIVANTES MINIMA	
		Nombre initial de spores	Doses
aérobiose	ambiante	NP	400 Kreps
"	"	NP	320 Kreps
"	"	NP	300 Kreps
"	"	NP	360 Kreps
"	"	NP	380 Kreps
"	"	NP	220 Kreps
"	"	NP	300 Kreps
"	"	NP	220 Kreps
"	"	NP	340 Kreps
"	"	NP	300 Kreps
"	"	NP	140 Kreps
aérobiose	ambiante	NP	140 Kreps
"	"	NP	220 Kreps
aérobiose	ambiante	10^5 /ml	240 Krads
aérobiose	ambiante	10^4 /ml	170 Krads

Tableau XXXXII : RADIOSENSIBILITE DE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION
Sommer (304)	Trichoderma viride	eau distillée
	Geotrichum candidum	"
	Mucor sp	"
	Botrytis cinerea	"
	Diplodia natalensis	"
	Rhizopus stoloniger	"
	Alternaria citri	"
	Cladosporium herbarum	"
	Alternaria tenuis	"

CHAMPIGNONS DIVERS

ATMOSPHERE	TEMPERATURE	DOSES INACTIVANTES MINIMA	
		Nombre initial de spores	Doses en Krads
aérobiose	ambiante	10^4	65
"	"	10^4	200
"	"	10^4	200
"	"	10^4	230
"	"	10^4	250
"	"	10^4	340
"	"	10^4	360
"	"	10^4	465
"	"	10^4	560

V.3. - Radiosensibilité des virus (voir tableaux XXXXIII à XXXXVII, pages 176 à 185).

Les courbes doses-survivants sont le plus souvent exponentielles, mais des exceptions ont été observées. Par exemple, Ghys et Coll. (140) ont obtenu des courbes composites pour les myxovirus irradiées à -78°C , alors que les courbes sont exponentielles à $+20^{\circ}\text{C}$. A -78°C , il devient malaisé d'inactiver les dernières particules virales. Kaplan (191) a observé un phénomène similaire avec le virus de la vaccine. L'inactivation est exponentielle lorsque l'irradiation est faite en tampon. Par contre, à l'état sec la courbe est exponentielle jusqu'à 4 Mrads ($D_{10} = 0,64$ Mrad), puis un plateau est atteint et les particules virales restantes survivent jusqu'à 11 Mrads.

Dans ces deux cas, les auteurs pensent que la survie exceptionnelle observée pourrait s'expliquer par le mécanisme de réactivation virale.

Il est difficile de comparer les radiosensibilités entre les différentes familles de virus en raison des variations observées dans une même famille. En effet, comme pour les autres microorganismes, la présence de protéines dans le milieu (312 - 189), l'irradiation à l'état sec (191) ou à basse température (140 - 313) modifient considérablement la radiosensibilité des virus.

Malgré cela, il est évident que les virus sont en général très radiorésistants. Par exemple, les trente virus étudiés par Sullivan (312) ont une D_{10} comprise entre 0,39 et 0,53 Mrad lorsqu'ils sont irradiés en milieu de Eagle additionné de sérum.

Les doses inactivantes minima sont très rarement inférieures à 1 Mrad, mais le plus souvent comprises entre 2 et 3 Mrads et peuvent même atteindre de 6 à 12 Mrads.

Tableau XXXXIII : RADIOSENSIBILITE DES

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Polley (261)	M. influenza A	sérum physiologi- que	aérobiose
	M. influenza B	"	"
Ghys et Coll. (140)	M. influenza A ₁ /AA/1157	liquide allantoïque	aérobiose
	M. influenza A ₂ /Australia/57	"	"
	M. influenza B/GL/1739	"	"
	M. influenza B/Taiwan/63	"	"
Sullivan et Coll. (312)	M. influenza A	milieu de Eagle + 2 % de sérum de veau	aérobiose
	M. influenza A	eau distillée	aérobiose
Transy (331)	M.parainfluenza 3	hydrolysate de lactalbumine	aérobiose

MYXOVIRUS

TEMPERATURE	D10 en MRADS	DOSES INACTIVANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
ambiante	0,110		
"		$1 \cdot 10^4 / \text{ml}$	1 Mrad
ambiante	0,094		
"	0,138		
"	0,075		
	0,082		
0,5° C	0,46		
0,5° C	0,10		
ambiante	0,39		

Tableau XXXIV : RADIOSENSIBILITE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Jordan et Kempe (189)	souche Lansing	extrait de cerveau	aérobiose
	souche Lansing	sérum physiologi- que	aérobiose
Dick et Coll. (108)	souche Lansing	solution saline	aérobiose
	"	"	"
	"	"	anaérobiose
Bonet-Maury et Coll. (42)	type 1	NP	NP
Sullivan et Coll. (312)	I - MAH	milieu de Eagle + 2 % de sérum foe- tal de veau	aérobiose
	I - Lotshaw	"	"
	II - Lansing	"	"
	III - Léon	eau distillée	"
	III - Léon	milieu de Eagle + 2 % de sérum	"
	III - Nadler	"	"
Transy (331)	Souche Sabin type I	milieu de Hanks	aérobiose
	Souche Sabin type I	hydrolysate de lactalbumine	aérobiose

a = log des DL 50

b = dilution du virus qui donne une DL 50

NP = non précisé

DES POLIOVIRUS

TEMPERATURE	D10 en MRADS	DOSES INACTIVANTES MINIMA	
		Nombre initial de germes	Doses
- 72° C		6 ^a	4 Mreps
- 72° C		6 ^a	3 Mreps
- 78° C		10 ^{-4,2} ^b	1,6 Mrep
- 198° C		10 ^{-3,8} ^b	2 Mreps
- 78°C		10 ^{-4,2} ^b	2,5 Mreps
NP	0,4		
0,5° C	0,49		
"	0,53		
"	0,41 à 0,54		
"	0,11		
"	0,41 à 0,54		
"	0,48		
ambiante	0,35		
"	0,58		

Tableau XXXXV : RADIOSENSIBILITE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION
Sullivan (312)	A ₉	milieu de Eagle + 2 % de sérum foetal de veau
	A ₉	eau distillée
	A ₁₁	milieu de Eagle + 2 % de sérum de veau
	B ₁	"
	B ₂	"
	B ₂	eau distillée
Sullivan (313)	B ₂	eau distillée
	"	"
	"	milieu de Eagle + 2 % de sérum de veau
	"	"
	"	"
	"	"
	"	viande de boeuf cuite
	"	"
	"	"
	"	viande de boeuf crue
	"	"
	"	"
Sullivan (312)	B ₃	milieu de Eagle + 2 % de sérum de veau
	B ₄	"
	B ₅	"

DES COXSACKIEVIRUS

ATMOSPHERE	TEMPERATURE	D10 en MRAD
aérobiose	0,5° C	0,46
"	"	0,12
"	"	0,48
"	"	0,41
"	"	0,45
"	"	0,14
aérobiose	0,5° C	0,14
"	- 90° C	0,53
"	0,5° C	0,45
"	- 30° C	0,69
"	- 60° C	0,59
"	- 90° C	0,64
"	16° C	0,70
"	0,5° C	0,76
"	- 90° C	0,81
"	- 30° C	0,75
"	- 60° C	0,71
"	- 90° C	0,68
aérobiose	0,5° C	0,35 à 0,43
"	"	0,50
"	"	0,41

Tableau XXXVI : RADIOSENSIBILITE DES

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION
Sullivan (312)	Echovirus type 4	milieu de Eagle + 2 % de sérum foetal de veau
	" type 5	"
	" type 6	"
	" type 7	"
	" type 9	"
	" type 11	eau distillée
	" type 11	milieu de Eagle + 2 % de sérum foetal de veau
	" type 12	"
	" type 18	"
Sullivan (312)	Adenovirus type 2	milieu de Eagle + 2 % de sérum foetal de veau
	" type 3	"
	" type 5	"
	" type 12	"

ECHOVIRUS ET DES ADENOVIRUS

ATMOSPHERE	TEMPERATURE	D10 en MRADS
aérobiose	0,5° C	0,46
"	"	0,49
"	"	0,51
"	"	0,38 à 0,57
"	"	0,50
"	"	0,14
"	"	0,43
"	"	0,50
"	"	0,44
aéorobiose	0,5° C	0,41
"	"	0,49
"	"	0,44
"	"	0,46

Tableau XXXXVII : RADIOSENSIBILITE

REFERENCES	SOUCHES	MILIEU D'IRRADIATION	ATMOSPHERE
Kaplan (191)	Vaccine "	tampon phosphate suspension deshydratée	aérobiose "
Jordan et Kempe (189)	Vaccine "	extrait de cerveau sérum physiologi- que	aérobiose "
Bonet-Maury et Coll. (42)	Vaccine	NP	NP
Polley (261)	Herpes simplex	sérum physiologi- que	aérobiose
Sullivan et Coll. (312)	Herpes simplex	milieu de Eagle + 2% de sérum de veau	aérobiose
Reitman et Tonik (279)	Virus de l'encé- phalite équine Vénézuélienne (VEE)	milieu de Eagle	aérobiose
Gruber (154)	VEE	tampon tris	aérobiose
Jordan et Kempe (189)	Virus de l'encé- phalite équine de l'Ouest "	extrait de cerveau virus en suspension dans sérum Q	aérobiose aérobiose
Jordan et Kempe (189)	Virus de l'encé- phalite de Saint-Louis "	extrait de cerveau virus en suspension dans sérum physiolo- gique	aérobiose "
Sullivan et Coll. (312)	Virus Newcastle disease Reovirus I SV 40	milieu de Eagle + 2% de sérum de veau " "	aérobiose " "
Kenny et Coll. (198 bis)	virus de la rubéole "	milieu 199 seul ou + 1% d'albumine milieu 199 + 1 % cystéine	aérobiose "

1 = log de la plus forte dilution donnant une DL 50

NP = non précisé

DE VIRUS DIVERS

TEMPERATURE	D10 en Mrads	DOSES INACTIVANTES MINIMA	
		Nombre initial de virions	Doses
ambiante		10^7	0,6 à 0,8 Mrad
"		10^7	11 Mrads
ambiante		6^1	2,5 Mreps
"		6^1	1,5 Mrep
NP		6^1	12 Mrads
ambiante		NP	1 Mrad
+ 0,5° C	0,39 à 0,42		
NP		9^1	8 Mrads
- 78° C		$8,6^1$	6 Mrads
ambiante		6^1	3,5 Mreps
ambiante		6^1	2,5 Mreps
ambiante		6	4 Mrads
"		6	3 Mrads
0,5° C	0,52		
"	0,42		
"	0,45		
- 70° C	0,28 à 0,41		
- 70° C	0,56		

V.4. - Vue d'ensemble de la radiosensibilité des microorganismes

Nous venons de voir en détail, les radiosensibilités des différents microorganismes lorsqu'ils sont irradiés dans des conditions variables : différents milieux, présence ou non d'oxygène, variations de la température et de la teneur en eau, etc... Pour une même espèce, ces conditions d'irradiation influencent de façon parfois importante les niveaux de résistance ; malgré cela, il est possible de classer les microorganismes par ordre de radiorésistance croissante, de la façon suivante :

- Bactéries Gram négatif. Ce sont, en effet, les plus sensibles puisque en eau distillée ou en tampon, les D10 sont rarement supérieures à 20 Krads et peuvent même être aussi basses que 3 Krads (*Pseudomonas*). Dans des conditions de résistance maximales une dose de 300 à 600 Krads donne en général un facteur d'inactivation * égal ou le plus souvent supérieur à 10^6 .

- Mycobactéries : elles sont également radiosensibles.

- Bactéries Gram positives non sporulées.

Si l'on exclut les espèces qui ont une radiorésistance exceptionnelle, ce groupe est malgré tout plus résistant que les précédents. Les D10 sont le plus souvent comprises entre 15 et 70 Krads lorsque l'irradiation est faite en tampon ou en eau distillée.

Elles sont évidemment plus élevées lorsque l'environnement est protecteur et en particulier à l'état sec. Dans ces conditions, avec une dose de 1 à 1,5 Mrad, le facteur d'inactivation est supérieur ou égal à 10^6 .

- Champignons (spores), une dose de 0,6 Mrad donne un facteur d'inactivation supérieur ou égal à 10^5 lorsque l'irradiation est effectuée en tampon.

- Levures : elles sont plus résistantes que les champignons puisqu'en tampon, la dose stérilisante est souvent supérieure à 1 Mrad.

- Spores bactériennes : les D10 sont le plus souvent comprises entre 0,1 et 0,4 Mrad , mais peuvent être parfois plus élevées dans certaines

* Le facteur d'inactivation est le nombre de germes inactivés par une dose donnée.

conditions d'irradiation. Un coefficient d'inactivation de 10^6 au plus est obtenu dans la majorité des cas avec une dose de 2,5 Mrads.

- Virus : dans la majorité des cas, les D10 sont égales ou supérieures à celles des spores les plus radiorésistantes (exception faite de B. sphaericus C₁A). Les doses inactivantes peuvent être supérieures à 2,5 Mrads et même atteindre 6, voire 12 Mrads.

Cette classification peut paraître un peu arbitraire, car les niveaux de résistance se chevauchent d'un groupe à l'autre.

D'autre part, des souches font exception à la règle, leur résistance étant beaucoup plus élevée que celle du groupe correspondant. C'est le cas des Acinetobacter pour les bacilles Gram négatif, de Streptococcus faecium A₂1 et Micrococcus radiodurans pour les cocci Gram positif, de certaines Corynebactéries pour les bacilles Gram positif non sporulés et de Bacillus sphaericus C₁A pour les sporulés.

Quelques figures permettent de visualiser la gamme des radiosensibilités chez les bactéries.

La figure n° 15 (page 188) montre la radiorésistance de quelques souches bactériennes irradiées en tampon.

Les figures n° 16 et 17 (pages 188 - 189) montrent les niveaux de résistance déterminés par Christensen (74) pour certaines souches irradiées à l'état sec.

Sur la figure n° 16 sont portées les courbes d'inactivation de bactéries isolées à partir de prélèvements de poussière. 99 % des contaminants ont un facteur d'inactivation de 10^8 avec une dose d'environ 1,5 Mrad. Le même coefficient d'inactivation est obtenu pour les spores de Bacillus et de Clostridium avec une dose inférieure à 3 Mrads. Certains Micrococci et une souche de Corynebactérie sont plus résistants.

A titre comparatif, on peut voir sur les deux autres figures (n° 17 et 18, pages 189), les courbes d'inactivation des espèces très radiorésistantes.

V.5. Mécanismes responsables des différences de radiosensibilité chez les microorganismes.

Actuellement les mécanismes de l'action léthale des rayons ionisants ne sont pas encore bien connus, par conséquent, il est encore

Fraction survivante

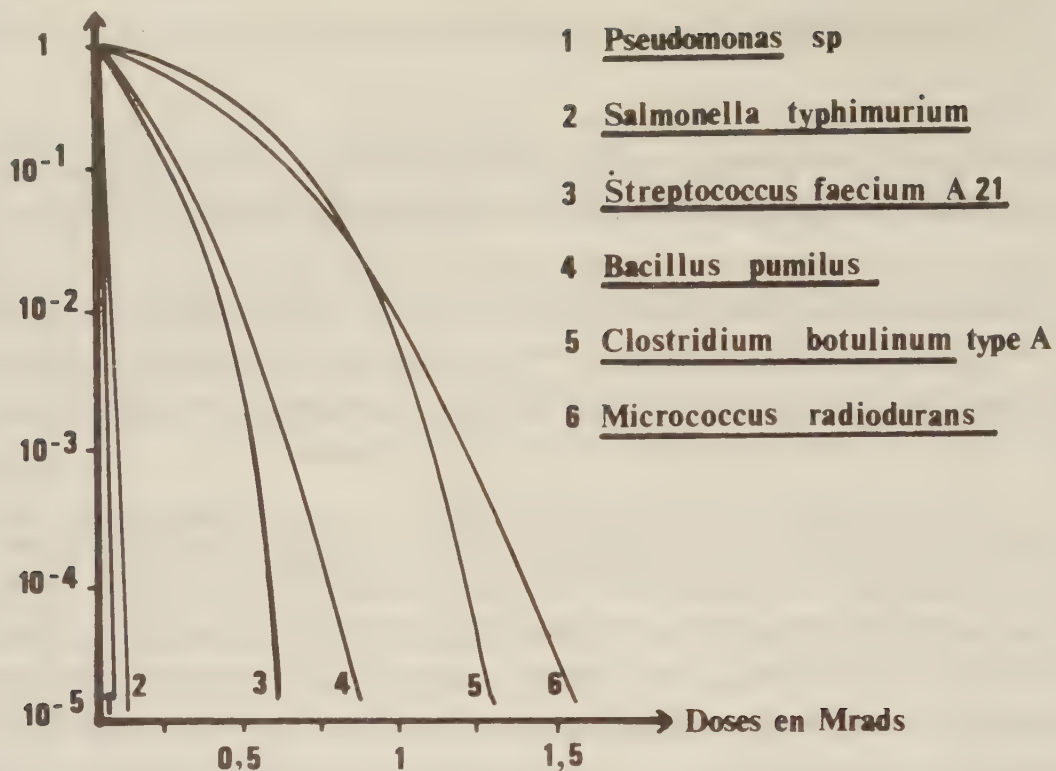


Figure 15 : RADIOSENSIBILITE DE DIFFERENTES SOUCHES BACTERIENNES
IRRADIEES EN TAMPON PHOSPHATE ET EN ANAEROBIOSE

D'après LEY (215)

Fraction survivante

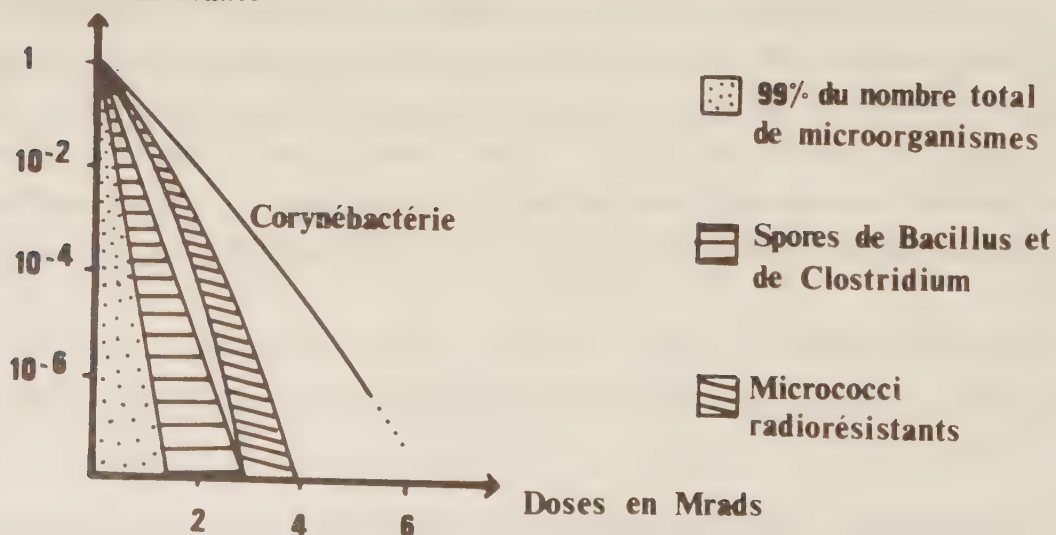


Figure 16 : COURBES D'INACTIVATION DES BACTERIES ISOLEES DE
PRELEVEMENTS DE POUSSIERE ET IRRADIEES A L'ETAT SEC

D'après CHRISTENSEN (74)

Fraction survivante

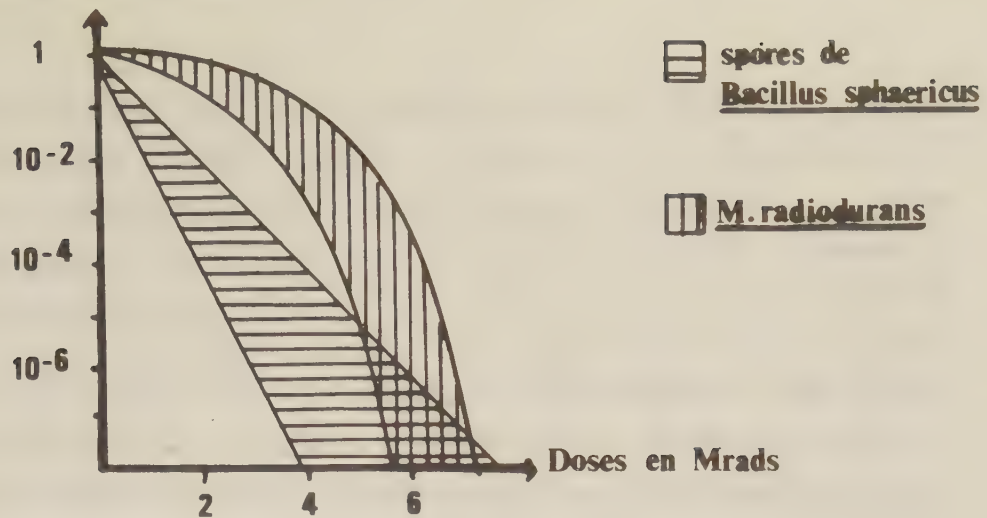


Figure 17 : RADIORESISTANCE DE 5 SOUCHES DE B.SPHAERICUS ET DE 7 SOUCHES DE M.RADIODURANS IRRADIEES A L'ETAT SEC
D'après CHRISTENSEN (74)

Fraction survivante

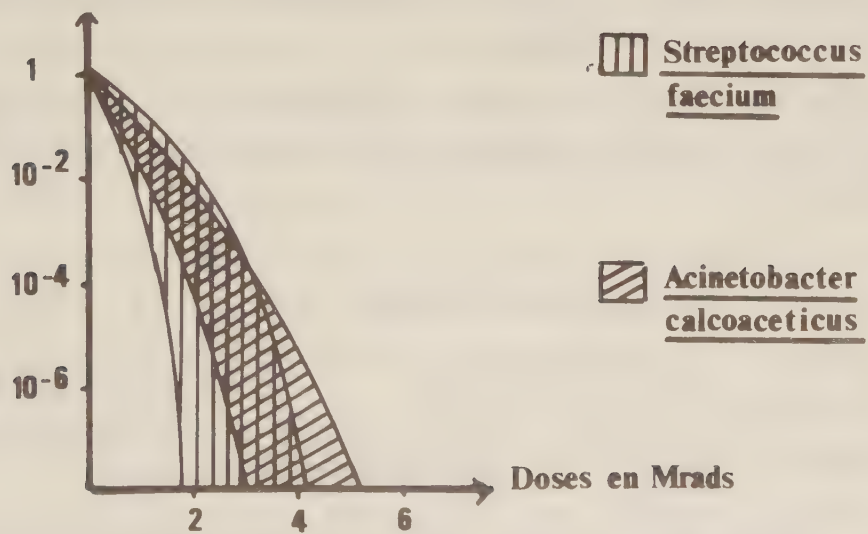


Figure 18 : RADIORESISTANCE DE 48 SOUCHES DE S.FAECIUM ET DE 15 SOUCHES DE A.CALCOACETICUS IRRADIEES A L'ETAT SEC
D'après CHRISTENSEN (74)

difficile d'expliquer les différences de radiosensibilité. Cependant, des hypothèses ou des débuts de réponse peuvent être avancés. Nous avons vu précédemment que le génome est probablement le principal site sensible dans la cellule. Un certain nombre de travaux ont permis de montrer qu'il existe une relation entre la radiosensibilité et la teneur en acide nucléique. Par exemple, Kaplan et Moses (194) ont étudié les relations existant entre la radiosensibilité et la teneur en acide nucléique de 4 groupes d'organismes classés par ordre croissant de radiosensibilité (déterminée dans des conditions d'action directe) ; virus à ARN ou ADN monocaténaire, virus à ADN bicaténaire, bactéries et levures haploïdes, cellules aviaires ou de mammifères. Des courbes de régression ont été tracées pour chaque groupe. La pente de ces courbes a montré que plus le chromosome a une taille importante, plus la radiosensibilité est grande. Le résultat est donc en agrément avec la théorie de la cible de Léa (209). Etant donné que les ionisations sont produites au hasard, il est certain que plus la cible est petite, plus la probabilité d'inactivation est faible.

La taille du génome est donc une des raisons expliquant pourquoi les virus ont une radiosensibilité faible, mais il est évident que cela n'explique pas toutes les différences de radiosensibilité en particulier chez les bactéries.

Nous allons voir maintenant quels sont les autres mécanismes impliqués en examinant séparément bactéries végétatives et spores bactériennes.

V.5.1. - Bactéries végétatives

En 1962, Kaplan et Zavarine (193) ont découvert qu'il existait une corrélation étroite entre la teneur en guanine-cytosine (G-C %) des ADN bactériens et la sensibilité aux rayons X.

8 espèces bactériennes sélectionnées dans cette étude sont citées ci-dessous par ordre de sensibilité croissante avec leur G-C % :

Espèces	G-C %
Bacillus cereus	33
Staphylococcus aureus	34
Bacillus subtilis	43

<i>Escherichia coli</i>	50
<i>Azotobacter agile</i>	52
<i>Serratia marcescens</i>	58
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68

La relation des D10 en fonction du G-C % est linéaire. Par contre, avec les mêmes bactéries, il existe une relation inverse entre G-C % et résistance aux rayons ultra-violets. Cependant, cette relation entre sensibilité aux rayons ionisants et G-C % n'est pas retrouvée avec toutes les espèces puisque par exemple Micrococcus radiodurans a un G-C % voisin de celui des *Pseudomonas* et qu'il est par ailleurs très résistant aux U.V. (144).

Les différences de radiosensibilité pourraient être expliquées également par la capacité de certaines souches de restaurer les lésions radioinduites de l'ADN. Cette capacité de restauration a d'abord été découverte dans le cas de l'irradiation par les rayons ultra-violets. L'effet léthal de ces derniers est dû à la formation de dimères de la thymine. Or, Setlow et Carrier (293), Boyce et Howard-Flanders (172) ont montré que certaines souches étaient capables de réparer les lésions de l'ADN grâce à un mécanisme d'excision, puis d'insertion. En effet, une endonucléase excise les dimères de thymine et les bases adjacentes, puis les trous formés sont comblés par insertion de nucléotides, le brin opposé servant de moule ("template").

Ce mécanisme permet d'expliquer la différence de sensibilité aux U.V. entre E. coli B, E. coli B/r (mutant radiorésistant de E. coli B) et E. coli Bs-1 (mutant radiosensible de E. coli B).

Adler (3), en se basant sur le fait que ces 3 souches ont la même échelle de résistance aux rayons ionisants, a suggéré qu'un tel système de restauration pouvait exister pour les rayons ionisants.

L'expérience de Mac Grath et Williams (227) a montré que c'était bien le cas. En effet, une dose de 20 Krads de rayons X produit des ruptures monocaténaïres qui sont réparées par E. coli B/r, lorsque la souche est incubée à 37° pendant 40 mn après l'irradiation. Par contre, chez E. coli Bs-1, ces lésions ne sont pas restaurées. Kaplan (195) a confirmé ces résultats et a montré que E. coli K₁₂

possédait également un système de restauration des ruptures monocaténaïres. Par contre, les ruptures bicaténaïres qui surviennent avec une fréquence plus faible ne sont pas restaurées.

Dans le processus de restauration, le brin intact sert de moule pour l'insertion des nucléotides complémentaires, on comprend donc pourquoi les ruptures bicaténaïres ne sont pas réparables. Il semble donc que certaines bactéries possèdent des équipements enzymatiques qui leur permettent de restaurer les radiolésions touchant un seul brin de ADN. Cette capacité de restauration pourrait expliquer certaines différences de radiosensibilité, mais elles n'expliquent pas par exemple, la résistance élevée de Micrococcus radiodurans.

Cette haute résistance de M. radiodurans a été attribuée à de nombreux facteurs :

- la teneur élevée en composés sulfhydriques. En effet, Bruce (58) a montré que des extraits de M. radiodurans avaient un effet radioprotecteur sur d'autres souches bactériennes comme E. coli B/r. Mais le dmf ne dépasse jamais un facteur de 5, même lorsque l'extrait est très concentré,
- la structure particulière de la paroi (330) qui a une teneur élevée en lipides et une couche de lipoprotéines. Le mucopeptide contient de l'acide diaminopimélique et un acide aminé non identifié,
- la présence de pigments de type caroténoïdes, mais des mutants non pigmentés sont également résistants.

Les deux premiers facteurs ne peuvent donc pas expliquer à eux seuls cette haute résistance.

Les travaux effectués ces dernières années concourent tous à montrer que Micrococcus radiodurans possède un système de restauration très efficace. Dean et Coll. (99) ont montré que pour une dose de 200 Krads qui laisse 100 % de survivants, le poids moléculaire de l'ADN est diminué (70 % du poids moléculaire normal), mais l'ADN est par la suite restauré. Par contre, si une seconde dose est donnée pendant le temps de latence précédant le début de la synthèse de l'ADN, les bactéries sont alors plus sensibles (8).

En 1968, Kitayama et Matsuyama (200) découvrent que le mécanisme de restauration est particulier puisque M. radiodurans paraît

capable de restaurer les ruptures bicaténares. La restauration est complète 180 mn après l'irradiation.

Par la suite, il a été montré que ces lésions ne peuvent être réparées si les synthèses des protéines et des ARN (201 - 236) sont inhibées.

Ce processus exceptionnel de restauration expliquerait l'existence de l'épaulement important des courbes de survie. En effet, les mutants sensibles qui ont pu être isolés (236 - 311) et qui ne possèdent pas le système de restauration ont des courbes de survie avec un épaulement réduit ou pratiquement nul.

D'autre part, les courbes de survie obtenues en présence de substances sensibilisantes comme l'iodoacetate sont exponentielles. Cette substance inhibe le processus de restauration et dans ce cas l'épaulement est totalement supprimé (98 - 300). Il a été montré, par ailleurs que les substances sensibilisantes iodées ne pénètrent pas dans la cellule, mais agissent au niveau de la membrane (7), le système de restauration serait donc associé à la membrane bactérienne comme c'est le cas pour l'ADN polymérase.

Les raisons de la différence de radiosensibilité entre les bactéries sont encore loin d'être totalement élucidées. Actuellement, il est possible de dire que ces différences sont liées à la teneur en G-C % de l'ADN et à l'existence de processus de restauration des radiolésions chez certaines espèces. La plupart d'entre elles ne seraient capables de restaurer que les ruptures monocaténaires, par contre, M. radiodurans possède un système de restauration particulier pouvant réparer les scissions bicaténares radioinduites de l'ADN.

V.5.2. - Mécanismes de radiorésistance chez les spores bactériennes

La radiorésistance des spores bactériennes a été attribuée à un certain nombre de facteurs :

- existence de protecteurs chimiques inertes,
- faible teneur en eau,
- conformation particulière de l'ADN.

En 1970, Tallentire (318) a présenté un bilan du rôle de ces différents facteurs dans la radiorésistance des spores. Très tôt, on

a pensé que l'acide dipicolinique pouvait être responsable de la radio-résistance comme il l'est dans la thermorésistance.

Bien que Woese (353) ait trouvé que certaines spores riches en acide dipicolinique étaient plus résistantes, cette corrélation n'a pas été toujours retrouvée (Yamazaki). D'autre part, Rowley et Newcomb (284) ont montré que la résistance aux radiations précède la formation de l'acide dipicolinique. Il se peut que celui-ci intervienne dans la résistance, mais il ne la dirige pas. On a pensé également au rôle protecteur de substances soufrées car Vinter (344) avait montré que les spores ont un taux de cystine 4 à 5 fois plus élevé que celui des formes végétatives. Mais la rupture de 10 % à 30 % des ponts disulfures et les agents bloquant les thiols ne modifient pas la radiorésistance des spores (Hitchins et Coll., 163). La résistance ne semble donc pas être liée à une protection par les substances riches en ponts disulfures.

Tanooka (320) et Tanooka et Sakakibura (321) ont montré que l'ADN transformant des spores intactes et des spheroplastes de spores, a une radiorésistance plus élevée que celles des formes végétatives. Par contre, la résistance de cet ADN extrait et purifié est la même que celles des formes végétatives.

Lorsque la membrane des spheroplastes est rompue par un choc osmotique la résistance de l'ADN est diminuée.

D'autre part, l'ADN purifié irradié dans un homogenat de spores est plus résistant que dans un extrait de cellules végétatives.

Ces résultats suggèrent donc que la structure des spores joue un rôle important dans la résistance.

Le rôle de la teneur en eau a été étudié en détail par Tallentire et Powers (316) car la faible teneur en eau des spores permettait de penser que là était le facteur principal de résistance.

Les spores de B. megaterium étudiées ont été mises en équilibre avec des pressions en vapeur d'eau variant de $2,5 \cdot 10^{-5}$ à 22 Tors. En présence d'oxygène, l'augmentation de la vapeur d'eau aboutit à une augmentation graduelle de la résistance. Par contre, en anoxie l'effet inverse est obtenu (diminution maxima de 25 %). La faible teneur en eau n'est donc pas toujours associée à une radiorésistance maximale. Des études sur l'inactivation des ADN des spores ont également été réalisées puisque le génome est la principale cible sensible.

Tanooka et Terano (322) ont montré que l'ADN sporal de Bacillus subtilis est plus résistant aux scissions induites par les radiations ionisantes que l'ADN des cellules végétatives. Enfin, les mêmes auteurs (324) ont également mis en évidence l'existence de processus de restauration chez les spores, mais ces restaurations existent également chez les cellules végétatives avec un taux identique (325).

Pour Tanooka et Terano, la haute résistance des spores serait due surtout à l'état conformationnel de l'ADN qui le rend plus résistant à l'attaque par les radiations ionisantes.

VI - APPLICATION DE LA STERILISATION PAR LES
RAYONNEMENTS IONISANTS

VI - APPLICATIONS DE LA STÉRILISATION PAR LES RAYONNEMENTS IONISANTS

Pas plus que les autres méthodes, la radiostérilisation n'est universellement applicable car certains matériaux sont altérés par les rayons ionisants. Cependant, elle possède un certain nombre d'avantages par rapport aux autres méthodes plus conventionnelles (24 - 188).

- Pénétration excellente et instantanée qui permet de stériliser le matériel dans son emballage définitif en évitant toute manipulation postérieure risquant de le contaminer. La liberté dans le choix de l'emballage est grande puisque ce procédé de stérilisation ne nécessite pas la pénétration de vapeur d'eau ou de gaz.
- C'est une stérilisation à froid car il n'y a pas d'élévation de température pendant le traitement. Elle est donc particulièrement intéressante pour les matériels thermosensibles.
- Le contrôle de la dose délivrée est satisfaisant.
- L'automatisation des installations industrielles amène une grande sécurité.
- C'est le seul procédé pouvant fonctionner en continu, ce qui permet donc une production importante.

Les domaines d'applications de la radiostérilisation sont nombreux :

- Stérilisation ou décontamination des denrées alimentaires
- Stérilisation de certains produits pharmaceutiques
- Stérilisation de tissus biologiques pour des banques de greffes (valves aortiques, os, nerfs, etc...)
- Préparation de vaccins
- Stérilisation d'objets médico-chirurgicaux à usage unique,
- Stérilisation d'objets médico-chirurgicaux à usage "répétitif".

Certaines de ces applications sont encore potentielles et font l'objet d'études expérimentales, seule l'avant dernière est utilisée à grande échelle, de façon industrielle.

Avant d'aborder l'étude détaillée des différentes applications de la radiostérilisation, nous examinerons dans un premier temps, les méthodes utilisées pour déterminer la dose stérilisante.

VI.1. - Détermination des doses stérilisantes

Nous avons vu précédemment que le "spectre" de radiorésistance des microorganismes est large et qu'un certain nombre de facteurs modifient cette radiorésistance, par conséquent il est difficile de dire à priori quelle est la dose stérilisante à appliquer à tel produit. La détermination de la dose stérilisante peut se faire par deux méthodes :

- méthode expérimentale,
- méthode théorique.

VI.1.1. - Méthode expérimentale,

Dans cette méthode, les produits à tester ou des échantillons artificiellement contaminés sont irradiés à différentes doses, puis contrôlés bactériologiquement. La plus faible dose pour laquelle aucun survivant n'est trouvé est la dose d'inactivation. Cette dose augmentée d'un certain facteur, de façon à avoir une marge de sécurité, est alors la dose stérilisante à appliquer (53). Pour que cette méthode soit valable, il faut connaître le nombre de germes contaminants présents avant stérilisation. En effet, la cinétique d'inactivation implique que la dose stérilisante n'est pas la même lorsque le nombre initial de germes est différent.

La méthode expérimentale a été utilisée lors des premiers travaux sur la radiostérilisation du matériel médico-chirurgical (22 - 48 - 96 - 204 - 250) et des denrées alimentaires. Elle est encore utilisée dans un certain nombre de cas notamment lorsqu'il est nécessaire d'étudier l'inactivation de germes placés dans un environnement particulier (denrées alimentaires, tissus biologiques).

VI.1.2. - Méthode théorique (37 - 53 - 70)

Cette méthode repose sur des bases mathématiques et statistiques dont les paramètres sont les suivants :

- nombre de germes contaminants habituellement le matériel avant stérilisation et évaluation du taux maximum de contamination pouvant être rencontré.
- radiosensibilité des espèces contaminantes dans leur environnement naturel, déterminée à l'aide des courbes de survie.
- marge de sécurité désirée. La notion de marge de sécurité est basée sur le fait que l'inactivation par les rayonnements ionisants suit une loi exponentielle et que par conséquent le nombre de germes survivants tend vers 0, mais ne sera jamais nul. Ceci n'est pas particulier à la radiostérilisation, puisque les stérilisations par la chaleur et par oxyde d'éthylène suivent une loi identique, en effet les courbes d'inactivation sont également exponentielles (55 - 75 - 207).

Il n'est donc pas possible d'affirmer qu'une dose X garantit une stérilité absolue, on peut seulement calculer la probabilité de laisser un germe viable pour un nombre d'échantillons donné. Supposons que l'on veuille stériliser des articles médicaux dont la contamination maximum est de 10 germes par article. Si l'on applique une dose X dont le facteur d'inactivation est de 10^7 (dose faisant chuter la population de 10^7 à 1 germe), la probabilité de laisser persister un germe viable sera de 1 pour 10^6 articles.

Le calcul de la dose à appliquer est donc relativement simple lorsque les trois paramètres sont connus.

Si nous reprenons l'exemple précédent, le nombre de germes par article est 10, la D10 du contaminant le plus résistant a été déterminée, la marge de sécurité désirée est de 1 pour 10^6 , la dose X à utiliser qui doit donner un facteur d'inactivation de 10^7 sera donc de 7 fois la D10 du germe le plus résistant.

Cette méthode est donc certainement la plus fiable, car elle repose sur des données parfaitement quantifiées, d'autre part, la marge de sécurité est connue puisqu'elle est choisie à priori et intervient dans le calcul de la dose.

La marge de sécurité choisie correspond en général à celle qui est obtenue par stérilisation par autoclavage.

Cette méthode de calcul de la dose stérilisante est utilisée pour la stérilisation de denrées alimentaires et surtout pour la stérilisation du matériel médico-chirurgical à usage unique.

VI.2. - Radiostérilisation et "radiopasteurisation" des denrées alimentaires.

L'inactivation des microorganismes par les rayons ionisants appliquée à la conservation des denrées alimentaires peut être utilisée de deux façons :

- Stérilisation de façon à obtenir une conservation indéfinie des denrées périssables.

- "Pasteurisation" avec deux buts différents, soit élimination partielle de la flore contaminante pour augmenter la durée de conservation, soit élimination des germes pathogènes (*Salmonella*).

VI.2.1. - Stérilisation des aliments

Elle a été une des premières tentatives d'application de la radiostérilisation et les premiers travaux ont été dirigés par Proctor et Goldblith du Massachusetts Institute of Technology (271 - 272 - 146).

Les doses stérilisantes pour différents aliments ont été déterminées par cette équipe (314) :

- lait	0,75 à 1 Mrad
- lait congelé	1 Mrad
- boeuf haché	1,5 Mrad
- haddock	0,9 à 1,5 Mrad
- jus d'orange	1 Mrad

Mais un des problèmes pour la stérilisation des aliments non acides en conserve , est la survie et le risque de multiplication de Clostridium botulinum qui est le plus résistant des germes pathogènes pouvant contaminer les aliments. Aussi l'inactivation de ce germe est le principal facteur dans la détermination de la dose stérilisante à utiliser.

Kempe et Coll. (198) ont montré que lorsque le nombre de spores de Cl. botulinum type A varie de 0,4 à 40 000 par gramme, la dose stérilisante nécessaire pour la stérilisation de viande en conserve varie de 2 à 4 Mreps.

Schmidt (289) a proposé en 1963 une méthode théorique pour la détermination de la dose stérilisante en prenant comme prémisses que la radiostérilisation doit donner le même taux d'inactivation de Cl. botulinum que la stérilisation par la chaleur. Pour celle-ci, il est admis que le taux d'inactivation est de 10^{12} spores.

Schmidt a donc préconisé d'utiliser une dose stérilisante égale à 12 D10. La D10 peut être calculée à partir des courbes de survie ou par les méthodes du point final proposées par Schmidt et Nank (288), Anellis et Coll. (18), et Stumbo (309), (les méthodes de calcul de la D10 figurent dans le paragraphe III.1.).

La dose stérilisante proposée par Schmidt est de 4,45 Mreps à 4,8 Mreps (D10 de 0,37 à 0,4 Mrads).

Cette méthode de calcul implique que la cinétique d'inactivation est exponentielle, ce qui n'est pas toujours le cas. En effet, les courbes de survie peuvent être sigmoïdes avec un épaulement relativement important comme l'ont observé Roberts et Ingram (281), et Anellis, Grecz et Berkowitz (15). D'autre part, ces derniers ainsi que Wheaton et Pratt (349) ont montré que les dernières spores survivantes étaient difficiles à inactiver puisqu'aux fortes doses la pente de la courbe devient faible ("Tailing effect"). Cependant, ce concept des 12 D10 a été admis (147) car la marge de sécurité est importante.

Pour certains (Bridges, 54), au contraire, cette marge de sécurité est trop élevée car il est rare que des aliments puissent être contaminés par plus de 10^1 à 10^2 spores de Cl. botulinum par gramme et l'utilisation de dose de 4 à 5 Mrads entraîne une détérioration de la qualité des aliments.

Nous abordons ici un des problèmes majeurs de la stérilisation des denrées alimentaires par les radiations ionisantes. En effet, l'irradiation à fortes doses modifie les qualités organoleptiques des aliments : changement de couleur, modification de la saveur et de l'odeur. Des méthodes ont été proposées pour diminuer ces effets (299) :

- élimination de l'oxygène dans les emballages,
- irradiation à très basse température.

De 1965 à 1970, l'armée américaine s'est engagée dans un programme de recherche pour mettre au point une technique de radiostérilisation

des denrées alimentaires applicable à une production commerciale. Malgré les résultats encourageants obtenus pour la stérilisation de bacon, de jambon cuit et de viande de porc fraîche (16 - 17 - 19), la radio-stérilisation (le terme radioappertisation a été récemment proposé) des aliments reste encore du domaine expérimental.

VI.2.2. Radiopasteurisation des aliments

Quand il est apparu que les denrées alimentaires supportaient difficilement de fortes doses d'irradiation, des expérimentations utilisant de faibles doses ont alors été conduites avec deux objectifs différents:

- soit augmentation de la durée de conservation de denrées alimentaires fraîches,
- soit élimination des espèces pathogènes représentant un danger pour la santé publique.

VI.2.2.1. - Augmentation de la durée de conservation

Cette technique s'applique à des denrées alimentaires fraîches qui doivent donc être maintenues réfrigérées (0° C à 5° C) et l'objectif est d'éliminer ou de réduire la flore contaminante responsable de la détérioration. En général, la flore psychrophile Gram négative qui est la principale responsable de la mauvaise conservation (197 - 211 - 327) est radiosensible (Pseudomonas).

Pour une application valable de la radiopasteurisation, certains facteurs doivent être envisagés (299) :

- le nombre initial de microorganismes ne doit pas être trop élevé,
- les denrées alimentaires doivent pouvoir être maintenues à une température aussi basse que possible,
- l'emballage doit être étudié de façon à éviter une recontamination après irradiation,
- la dose d'irradiation doit être assez basse pour maintenir intactes les qualités organoleptiques initiales.

Deux types de denrées alimentaires ont été particulièrement étudiées, la viande fraîche et les poissons. Pour les poissons qui sont une des denrées les plus périssables, la radiopasteurisation a été considérée comme étant particulièrement adaptable (180).

Les doses employées sont toujours inférieures à 1 Mrad et même très souvent inférieures à 0,5 Mrad (180 - 197 - 211). L'irradiation n'élimine pas toujours la flore responsable de la détérioration, mais elle la réduit, ce qui permet d'augmenter de façon satisfaisante la durée de conservation.

Des essais ont également été effectués pour augmenter la conservation des poulets. Thornley et Coll. (327) ont montré que des doses de 0,25 et 0,5 Mrad éliminent totalement ou partiellement les Pseudo-monas.

Idziak et Incze (174) ont conclu qu'une dose de 0,5 Mrad augmente de 14 jours la durée de conservation à 5° C.

VI.2.2.2. - Elimination de germes pathogènes par irradiation

C'est l'élimination des Salmonella qui a fait l'objet du plus grand nombre de travaux (le terme Salmonella radicidation a été proposé). Les aliments dérivés de l'oeuf (oeuf complet, ovalbumine, jaunes d'oeuf congelés ou deshydratés) peuvent être contaminés par les Salmonella et être responsables de toxi-infections alimentaires (326); or la pasteurisation (sensu stricto) est difficilement applicable. C'est pourquoi la radiopasteurisation a été particulièrement étudiée (Ley - Comer - Thornley 329). Thornley (329) a rapporté qu'une dose de 0,5 Mrad est satisfaisante car elle correspond à une réduction d'environ 10^7 Salmonella).

Une étude française de Thieulin et Coll. (326) conclut qu'une dose de 0,375 Mrad améliore la qualité bactériologique de l'oeuf congelé qui ainsi traité présente des garanties de salubrité supérieures à celles du meilleur oeuf congelé naturel.

L'élimination des Salmonella de produits carnés a également été étudiée.

Une dose de 640 Krads donne un facteur d'inactivation de 10^5 pour de la viande de cheval congelé (Ley, 212).

La volaille est parfois contaminé par les Salmonella; ainsi Licciardello et Coll. (219) ont trouvé qu'aux U.S.A., 25 % de la volaille pouvait être contaminée (le nombre de contaminants ne dépassant pas 5 germes). L'auteur recommande une dose de 0,3 Mrad qui élimine environ 10^5 Salmonella. Avec cette dose, la probabilité de contamination par les Salmonella serait d'un poulet pour 80.000.

Pour Idziak et Incze (174) une dose de 0,5 Mrad qui permet d'augmenter la durée de conservation de la volaille élimine 10^{10} Salmonella et 10^{11} Staphylococcus aureus.

Previtte et Coll. (270) pensent également qu'une dose de 0,5 Mrad élimine les risques de transmission de Salmonella par la volaille.

L'utilisation de faibles doses d'irradiation a fait craindre que les mécanismes naturels de compétition entre les différents germes soient modifiés, ce qui favoriserait le développement des germes sporulés anaérobies pathogènes radiorésistants, tels que Cl. botulinum et Cl. perfringens.

Il a été admis (211) que ces risques sont éliminés si l'irradiation est faite à une température inférieure à 3° C, car dans ce cas la multiplication de Cl. botulinum (type E également) et de Cl. perfringens ne peut se produire.

L'utilisation des rayons ionisants pour la conservation des denrées alimentaires a suscité de très nombreux travaux. L'International Atomic Energy Agency (I.A.E.A.) a d'ailleurs régulièrement publié des bilans au fur à mesure de la progression des connaissances sur ce sujet (179 - 180). A l'heure actuelle, des difficultés subsistent dans le domaine de la stérilisation en raison des modifications organoleptiques induites par les radiations. Par contre, l'utilisation de faibles doses d'irradiation permettant d'augmenter la durée de conservation ou d'éliminer certains germes pathogènes, semble plus prometteuse.

VI.3. Radiostérilisation de matériel médico-chirurgical à usage unique

C'est vers 1950 que les accessoires médicaux à usage unique firent leur apparition en pratique hospitalière aux Etats-Unis. Depuis leur utilisation s'est considérablement élargie et la place qu'ils occupent est sans cesse en expansion. Cette évolution a été possible grâce à la mise au point de nouveaux matériaux plastiques et au développement de nouvelles techniques de stérilisation (stérilisation à l'oxyde d'éthylène et stérilisation par les rayonnements ionisants) permettant de traiter ces objets thermosensibles.

Les travaux effectués dans trois pays, U.S.A., Grande-Bretagne, et Danemark, ont beaucoup contribué au développement de la radiostérilisation et à la mise au point de règles d'utilisation (87).

Aux Etats-Unis, dès 1956 la société Ethicon s'est équipée d'un accélérateur d'électrons pour la stérilisation de catgut. Ce fut la première utilisation industrielle de la radiostérilisation. En 1962, Ethicon entreprit d'équiper ses principales usines avec des unités au Cobalt 60 permettant de stériliser un volume de matériel de l'ordre d'une dizaine de m³ par jour.

Le rôle joué par la Grande-Bretagne fut très important. En 1960, la première installation importante d'irradiation au Cobalt 60, réalisée sous l'égide de l'autorité de l'Energie Atomique commença à fonctionner au Centre Nucléaire de Wantage. Depuis cette date, 6 autres irradiateurs industriels furent mis en service. Pour résoudre les problèmes techniques qui se posaient un groupe de travail fut créé (Panel on gamma and electron irradiation).

Ce "Panel" permit de mettre au point un dosimètre de référence (Perspex), d'entreprendre des études sur les niveaux de contamination bactérienne du matériel et sur le comportement sous rayonnement des produits pharmaceutiques. Plusieurs symposiums internationaux furent organisés par cet organisme.

Au Danemark, la radiostérilisation a débuté dès 1959. Des travaux bactériologiques très poussés furent réalisés :

- étude de la radiorésistance des bactéries pouvant contaminer le matériel,
- sélection de germes tests radiorésistants,
- choix des doses stérilisantes à appliquer en fonction des niveaux de contamination, et de la marge de sécurité.

Ces trois pays ont donc été des pionniers en matière de radiostérilisation. Par la suite de nombreux pays se sont également intéressés à ce procédé. En 1971, on pouvait dénombrer près de trente installations d'irradiation (87 - 178) :

- 6 en Grande-Bretagne,
- 4 en Allemagne,
- 3 en Italie,
- 2 aux Etats-Unis, Canada, Danemark, Suède, France, Australie,
- 1 aux Pays-Bas, Espagne, Tchécoslovaquie, Nouvelle-Zélande, Inde, Argentine.

Actuellement, des études sont en cours pour l'installation d'unités de radiostérilisation en Egypte, aux Phillipines, en Corée du Sud (186). En effet, malgré les investissements importants, la radiostérilisation qui est le seul procédé fonctionnant en continu, permettant donc de traiter un volume de matériel considérable, semble être une technique intéressante pour les pays en voie de développement.

Les principaux problèmes posés par la radiostérilisation des articles médico-chirurgicaux sont les suivants :

- tenue des matériaux sous rayonnement et compatibilité biologique
- choix de la dose stérilisante minimum avec comme corollaire une connaissance du niveau de contamination du matériel avant irradiation et une surveillance des conditions d'hygiène de fabrication (ce dernier point n'est d'ailleurs pas spécifique de la radiostérilisation),
- contrôles microbiologiques après irradiation.

L'Agence Internationale pour l'Energie Atomique (I.A.E.A.) a contribué à faciliter la mise en oeuvre de la radiostérilisation. En 1967, elle a organisé une conférence internationale au cours de laquelle un "code des bons usages" fut proposé (178).

Une seconde réunion fut tenue à Risö en 1972 pour la révision du "Code of Practice" (185). En 1973, un manuel sur la stérilisation par irradiation du matériel médical et biologique a été édité (184).

Enfin, en décembre 1974, l'I.A.E.A. a organisé à Bombay un Colloque sur la radiostérilisation des produits médicaux et des tissus biologiques (186).

VI.3.1. - Tenue sous rayonnement des matériaux et différents types de matériel à usage unique radiostérilisés.

A l'origine, les catguts furent les premiers articles radiostérilisés, mais à l'heure actuelle différents types d'objets à usage unique sont stérilisés par les rayonnements ionisants.

De très nombreux matériaux peuvent être utilisés, métaux, verre (mais il se teinte en jaune brun, ce qui est un inconvénient pour les appareils d'optique), caoutchouc et polymères synthétiques. Ce sont surtout ces derniers qui peuvent sous rayonnement subir des modifications de structure (réticulation ou ruptures de chaînes).

Ces modifications peuvent entraîner (173) :

- des changements de poids moléculaire avec retentissement sur les qualités mécaniques : souplesse, résistance à la traction, etc... (44 - 45).
- dégagement gazeux H_2 , HCl , etc...
- changement de coloration.

La présence d'oxygène pendant l'irradiation est un facteur de dégradation, aussi les plastiques peuvent être stabilisés par addition de substances antioxydantes.

La stabilité des principaux matériaux figure dans le tableau suivant (tableau XXXXVIII, page 207).

Trois polymères posent des problèmes de tenue sous rayonnement : le téflon, le chlorure de polyvinyl et le polypropylène.

- Le téflon est le seul qui ne peut être radiostérilisé sans dégradation excessive. Cependant, si l'irradiation a lieu en absence d'oxygène, sa stabilité est meilleure,

- Le chlorure de polyvinyl (PVC) : l'irradiation entraîne l'apparition d'une coloration brune et un dégagement d'acide chlorhydrique. Ce dernier point pose un problème important au point de vue biocompatibilité. D'autre part, si des pièces métalliques sont au contact ou à proximité du PVC irradié, il y a risque de corrosion (173). Mais ce problème est désormais en partie réglé grâce à la mise au point de PVC stabilisés.

Enfin, il faut savoir qu'en raison de ce dégagement de HCl , le PVC déjà traité par l'oxyde d'éthylène ne doit pas être radiostérilisé (ou vice versa) car il y a risque de formation d'éthylène chlorhydrine très toxique.

- Le polypropylène : irradié en présence d'air, il devient dur et cassant, mais des produits stabilisés ont été également mis au point.

Actuellement, le nombre d'objets à usage unique radiostérilisés est très important si bien qu'il n'est pas possible d'en dresser une liste exhaustive. Cependant, on peut les classer en trois groupes (25) :

- articles qui ne sont pas en contact direct avec les malades : vêtements de chirurgie (masques, pantalons, couvre-chaussures, etc...), boîtes de Pétri, pipettes, tuyaux et raccords divers, écouvillons, récipients divers pour les prélèvements de produits pathologiques, récipients

Tableau XXXXVIII : TENUE SOUS RAYONNEMENT DES DIFFERENTS MATERIAUX

Bonne stabilité jusqu'à	Matériaux	Commentaires
500 Mrads	Caoutchouc en polyurethane polystyrène résines epoxy	le plus stable des polymères
100 Mrads	Caoutchouc naturel Caoutchouc butadiène-styrène Acrylonitrile Polyéthylène (haute et faible densité) Nylons Polyester (Mylar-Melinex- Dacron) Bakelite Polyesters modifiés	deviennent durs à haute dose (100 Mds) peuvent se colorer en brun
10 Mrads	Caoutchouc aux silicones Néoprène Polycarbonate Esters de cellulose Laine	dégagement de HCl possible devient cassant à haute dose Acetate plus stable que nitrate
2,5 Mrads	Chlorure de polyvinyl Polypropylène Coton	dégagement de HCl- coloration
dégradation à partir de 1 Mrad	Téflon	Stabilité meilleure en absence d'oxygène

et emballages pour les préparations pharmaceutiques, etc...

- articles utilisés pour les soins médico-chirurgicaux : matériel de pansements (coton, gaze, tissus adhésifs), champs opératoires, gants de chirurgie, scalpels, seringues, aiguilles, collecteurs (urines, colostomie), sondes, cathéters, canules, drains, sutures, dispositifs de perfusion, oxygénateurs, hémodialyseurs, etc...

- articles implantés temporairement ou prothèses : shunts artérioveineux, nécessaires pour dialyse péritonéale, valves cardiaques, prothèses vasculaires, trachées artificielles, rotules artificielles, stimulateurs cardiaques, etc...

VI.3.2. Doses stérilisantes minima

La nécessité de déterminer une dose stérilisante minima est apparue dès que la radiostérilisation industrielle a commencé à se développer sur une large échelle. Les premiers travaux effectués aux U.S.A., et en Grande-Bretagne ont tous abouti à la conclusion qu'une dose de 2,5 Mrads était suffisante pour assurer la stérilité.

Les études sur la radiorésistance d'une grande variété de microorganismes de Koh (203), Bridges (48), Pepper (250) et Collaborateurs ont montré que les germes testés les plus résistants étaient inactivés par une dose de 2,5 Mrads. Artandi et Van Winkle (22) lorsqu'ils ont mis au point la radiostérilisation de catguts ont entrepris une étude expérimentale pour déterminer la dose minima stérilisante de 150 espèces différentes. Les auteurs choisirent une dose stérilisante de 2,5 Mrads qui était de 40 % supérieure aux doses minima nécessaires pour inactiver les microorganismes étudiés les plus résistants.

Les travaux de Darmady et Coll. (209) sur la radiostérilisation de cathéters et de seringues hypodermiques ont donné des résultats semblables. En effet, des cathéters artificiellement contaminés avec des spores de Clostridium tetani et de la terre desséchée, des supports en verre contaminés par Bacillus stearothermophilus et Clostridium tetani étaient stériles après une dose de 2 Mrads. Par ailleurs, une étude a été conduite avec 12 souches bactériennes (6 espèces végétatives et 6 sporulées). Des disques de papier filtre ont été contaminés avec une suspension de chacune de ces souches (100 disques) et irradiés à différentes doses. Avec 2 Mrads, seuls quelques disques imprégnés avec des

spores de B. pumilus contenaient encore quelques survivants. Les auteurs recommandèrent donc également une dose de 2,5 Mrads et proposèrent d'utiliser B. pumilus comme germe test.

Oliver et Tomlinson (244) ont montré que des aiguilles pour injection, des tubes de polyéthylène contaminés par différentes spores bactériennes en suspension dans du sang ou du sérum étaient stériles avec une dose de 2 Mrads.

Ces travaux avaient utilisé la méthode expérimentale de détermination de la dose basée sur les tests conventionnels de stérilité. Le taux de germes contaminants était relativement élevé (10^6 environ), mais la marge de sécurité n'était pas bien connue.

Dès 1960, Powell et Bridges (264) essayèrent de définir une dose stérilisante théorique. Il semblait logique de choisir une dose permettant d'obtenir un facteur d'inactivation semblable à celui obtenu habituellement avec la stérilisation par la chaleur. Mais d'après Powell et Bridges, ce facteur semblait difficile à estimer. En effet, un chauffage de 120°C pendant 20 mn ne donnerait selon eux une inactivation que de 5.10^2 spores de Bacillus stearothermophilus. Cependant en pratique, le facteur d'inactivation serait beaucoup plus élevé car B. stearothermophilus est un contaminant peu fréquent.

Les auteurs estimèrent qu'un facteur d'inactivation de 10^7 semblait adéquat. En se basant sur les courbes d'inactivation de Cl. sporogenes et de B. subtilis, une dose de 2,5 Mrads semblait suffisante pour obtenir une inactivation de 10^7 germes.

Les travaux de Burt et Ley (62) sur la radorésistance de B. pumilus démontrèrent qu'une dose de 2,5 Mrads correspondait à un facteur d'inactivation de 10^{15} pour une irradiation en aérobiose et de 10^7 lorsque l'effet protecteur est maximum. Les résultats rapportés sur la contamination de matériels tels que seringues et aiguilles ayant montré que le taux était faible (20 organismes viables par aiguille), ces auteurs estimèrent qu'une dose de 2,5 Mrads pouvait être considérée comme satisfaisante.

Une dose stérilisante minimum de 2,5 Mrads fut donc adoptée aux U.S.A. et en Grande-Bretagne. Par contre, les auteurs Danois à la suite de leurs travaux sur la radorésistance de Streptococcus faecium arrivèrent à une conclusion différente (68). En effet, 2,5 Mrads donnant un

facteur d'inactivation de 10^4 pour les souches de S. faecium les plus résistantes, ce taux leur apparut insuffisant d'autant plus que Streptococcus faecium est une souche potentiellement pathogène.

A la suite des travaux danois, des controverses se sont engagées pour le choix de la dose. En effet, si des doses élevées sont préconisées, certains matériels risquent de subir des dégradations.

En 1965, Ley et Tallentire (213) faisaient remarquer que pour la stérilisation par la chaleur, la technique habituelle de chauffage de 20 mn à 120° C, donne une inactivation du germe test (B. stearothermophilus) faible et que par conséquent, il n'y a pas de raison d'être plus sévère pour la radiostérilisation. Par ailleurs, ils soulignent que le facteur d'inactivation de S. faecium a été déterminé par les auteurs Danois dans des conditions de radioprotection maxima et que dans d'autres conditions (dessiccation dans du tampon) le facteur est plus important. Enfin, ils proposèrent une nouvelle méthode pour tester l'efficacité de la stérilisation, en l'occurrence utiliser en routine comme témoins, des échantillons délibérément exposés à toutes les conditions naturelles de contamination connues, puis de vérifier leur stérilité après irradiation.

Ces controverses sur le choix de la dose firent ressentir la nécessité d'entreprendre des études plus poussées sur le degré de contamination du matériel et sur la nature des contaminants habituels, étant bien entendu que ce matériel doit être fabriqué dans des conditions hygiéniques contrôlées, de façon à limiter la contamination avant stérilisation (ceci est d'ailleurs valable pour tous les procédés de stérilisation).

Les travaux entrepris sur le degré de contamination du matériel avant irradiation (voir paragraphe suivant) et les milliers de tests de stérilité effectués après irradiation [discussion p. 382, I.A.E.A. (178) Artandi (26)] ont montré qu'une dose de 2,5 Mrads était suffisante dans la majorité des cas, car le niveau de contamination est en général faible et la plupart des espèces contaminantes sont assez radiosensibles [Christensen et Coll. (74) ont d'ailleurs montré que pour 99 % des contaminants, 1 Mrad donne un facteur d'inactivation de 10^8]. Des travaux effectués en U.R.S.S. (251 - 338) ont abouti aux mêmes conclusions.

La plupart des pays ont donc adopté une dose minima stérilisante de 2,5 Mrads. Mais si l'on veut avoir une marge de sécurité de 1 germe survivant pour 10^5 à 10^6 articles, la contamination avant irradiation doit être faible. Les résultats d'Osterberg (246) sur la radiostérilisation de sutures (voir paragraphe suivant) ont montré que compte tenu de la fréquence d'isolement de souches radiorésistantes, une dose de 2,5 Mrads donne une marge de sécurité de 1 pour 10^6 , à condition que le nombre de contaminants par suture ne dépasse pas 10.

Par contre, la législation Danoise est la seule à avoir adopté des doses stérilisantes supérieures à 2,5 Mrads. Cette décision s'appuie sur les arguments suivants (76) :

- avec les tests de stérilité conventionnels, tous les travaux montrent qu'une dose de 2,5 Mrads est suffisante. Mais, il a été montré à maintes reprises que ces tests ne permettaient de détecter que des contaminations importantes (voir plus loin paragraphe VI.3.4.1.),

- la radiostérilisation doit avoir une efficacité microbiologique sur les germes les plus résistants, comparable à celles des méthodes conventionnelles.

- si un facteur d'inactivation élevé est désiré, le fait que 99 % du nombre total des microorganismes isolés de matériel médico-chirurgical ou de poussière soient faiblement radiorésistants est sans signification. En effet, dans une population mixte de microorganismes provenant de l'air ou de poussière, la présence de germes radiorésistants, même en faible nombre conditionne de façon importante le facteur d'inactivation obtenu (voir figure n° 19).

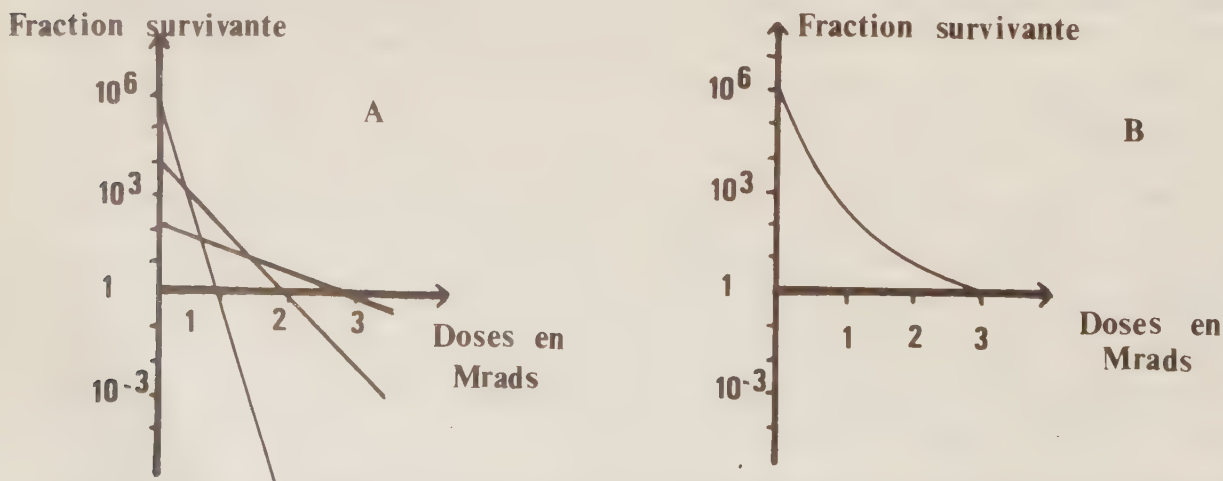


Figure 19 : COURBES D'INACTIVATION D'UNE POPULATION MIXTE DE MICRO-ORGANISMES.

Courbe A, courbes individuelles

Courbe B, courbe d'inactivation du mélange des 3 espèces.

D'après Christensen (76)

Donc, pour la radiostérilisation le facteur d'inactivation obtenu avec une dose X doit être calculé avec les germes les plus résistants, même si leur fréquence d'isolement est faible. Les auteurs Danois ont choisi St. faecium, car parmi les germes potentiellement pathogènes, c'est le plus radiorésistant.

Les autorités sanitaires danoises ont donc adopté les normes suivantes (70) qui sont basées sur le taux de contamination initial des articles :

- Dose minimum 3,5 Mrads pour un nombre de contaminants inférieur à 50 par article.
- Dose minimum 4,5 Mrads pour un taux compris entre 60 et 500.
- Dose minimum 5 Mrads pour un taux compris entre 500 et 5000.

Au delà de 5000 germes par article, la radiostérilisation est déconseillée.

VI.3.3. Contamination du matériel médico-chirurgical avant irradiation.

En 1965, Tattersall (323) a étudié la contamination de seringues dans leur emballage définitif. Sur 59 seringues testées, 25 % avaient de 0 à 10 germes, pour 75 % la contamination était inférieure à 100 germes par article. Le contaminant prédominant était Staphylococcus epidermidis, mais quelques germes sporulés furent également isolés. Les seringues étaient stériles après irradiation à 0,3 - 0,4 Mrad. La dose théorique de 2,5 Mrads correspondait à un facteur d'inactivation de 10^{17} .

Cook et Berry ont publié en 1967 (86) une étude importante sur la contamination initiale de seringues prises au hasard dans la production de 3 manufactures ou exposées volontairement à une contamination maximale. La flore aérobie de 964 seringues prélevées dans la production normale durant une période de 15 mois a été examinée. 23,4 % des seringues étaient stériles, 15 % avaient un nombre de contaminants compris entre 1 et 3, 15 % entre 4 et 9. 24,4 % contenaient entre 10 et 30 germes, environ 10 % entre 31 et 99, 5 % entre 100 et 300, 1 % entre 301 et 999. Deux seringues avaient plus de 1000 contaminants (1133 et 4275). Pour la flore anaérobie, 610 seringues ont été testées. Aucun germe anaérobie n'a été trouvé sur 80 % d'entre elles. Seules 3 seringues avaient entre 100 et 300 germes (soit 0,5 %) et une était contaminée

par 4275 germes. Au total, 91,4 % des seringues non stériles sont contaminées par moins de 100 germes.

Les seringues délibérément exposées à une contamination par la poussière n'avaient pas un taux de contaminants plus élevé (taux maximum 100). Par contre, des seringues manipulées régulièrement tous les jours pendant 1 semaine étaient plus fortement contaminées : les taux maximum trouvés étant de 13 000 pour les aérobies. Pour les seringues normales ou volontairement contaminées, les germes contaminants les plus fréquents étaient des cocci Gram + (mais aucun n'était du genre Streptocoque) et des diphtéroïdes. La contamination par les champignons est saisonnière avec un maximum en avril et mai. La radiosensibilité des germes isolés n'a pas été déterminée, mais en se basant sur les courbes d'inactivation des sporulés les plus résistants, les auteurs estiment qu'une dose de 2,5 Mrads est suffisante pour avoir une marge de sécurité de 1 pour 10^6 .

Christensen et Collaborateurs (72) dans un premier travail ont étudié les niveaux de contamination de seringues de différents volumes et de dispositifs de prélèvements de sang. 1678 seringues emballées, donc prêtes à être stérilisées ont été examinées. Selon le volume entre 10 et 30 % étaient stériles. Sur la totalité, 50 % avaient entre 1 et 3 contaminants. Seulement 0,54 % avaient plus de 100 contaminants, le maximum étant de 294. Le nombre moyen de contaminants est de 3,9 pour les seringues de 2 ml, 3,5 pour celles de 5 ml, 4,2 pour celles de 10 ml, et 10,8 pour les seringues de 20 ml. La majorité des microorganismes isolés étaient des Staphylococci et des Micrococci avec en plus quelques bacilles Gram + et quelques champignons. Les cultures anaérobies augmentent le nombre des germes isolés de 1,5 à 10 %, et dans la plupart des cas, les germes trouvés sont des Corynebactéries.

64 seringues délibérément contaminées par de la poussière ont également été contrôlées. Toutes ces seringues avaient entre 300 et 500 contaminants.

297 dispositifs de prélèvement de sang ont été soumis à l'étude. Le nombre de contaminants variait beaucoup selon les lots, ce qui peut être expliqué par le fait que la fabrication est moins automatisée que celle des seringues. Le nombre moyen de germes par article était de 0,3 pour le lot le plus propre et de 61 pour le lot le plus contaminé. 45 % des articles étaient stériles. Les taux de contamination les plus élevés

furent de 800 et 840. La flore contaminante était composée essentiellement de bacilles Gram positif sporulés et de Microcoques.

Dans un deuxième travail, Christensen et Collaborateurs (73) ont étudié la survie des germes sur des seringues artificiellement contaminées afin de voir quelle était la validité, en fonction du temps, des contrôles de la flore initiale. Des seringues de 5 ml ont été contaminées avec des cultures de Staphylococcus epidermidis, Bacillus globigii, E. coli, et un mélange de germes composant la flore cutanée normale.

Après contamination, les seringues ont été séchées et des numérations ont été effectuées à différents temps.

Pour S. epidermidis, le nombre d'organismes viables diminue en fonction du temps et descend en dessous de 0,1 % du nombre initial au 14ème jour. Pour les germes de la flore cutanée leur nombre décroît pendant les premiers jours et reste stable ensuite entre le 6ème et le 14ème jour. Pour E. coli, le nombre initial chute à 0,1 % en 24 heures. Comme on pouvait le penser, le nombre de spores de B. globigii est resté stable pendant la durée de l'expérience. Les auteurs ont donc conclu que du fait que le nombre des contaminants viables diminue rapidement, des contrôles sur la flore contaminante effectués plusieurs jours après la fabrication ne reflètent pas le niveau de contamination réelle. La présence d'un nombre faible de contaminants et l'absence d'entérobactéries ne prouvent donc pas que les conditions hygiéniques de production sont valables.

L'étude effectuée par Kronenwett (citée par Artandi, 26) sur la contamination de seringues , d'aiguilles et de cathéters a donné les résultats suivants :

Nombre d'articles contrôlés	Nombre moyen de germes viables par article
1560 seringues	6
1500 aiguilles	1,4
1580 cathéters IV.	5,5

Harakova et Buriankova (168) ont étudié la contamination initiale de différents matériels à usage unique : gants chirurgicaux, dispositifs de transfusion, "donor sets", dispositifs contraceptifs intra-utérins (DCI).

Les taux de contaminations obtenus figurent dans le tableau suivant :

Nombre de germes par article	Gants chirurgicaux	dispositifs de transfusion	"Donor Sets"	DCI "Danasuper"	DCI "Danacor"
0	76,4 %	12	0	10,8	0
1 - 10	21,6	56	31,3	78,4	54,5
11 - 100	0	32	64,2	10,8	41,8
101 - 500	0	0	4,5	0	3,7
501 - 2000	0	0	0	0	0

La flore contaminante avait la composition suivante :

	Pourcentage de souches isolées				
Germes	Gants chirurgicaux	dispositifs de transfusion	"Donor Sets"	DCI "Danasuper"	DCI "Danacor"
Cocci Gram +	31,4	47,4	54,6	43,8	37,4
Bacilles sporulés aérobies	28,6	28,1	18,5	15	37,4
Bacilles Gram négatif	0	3,5	1,1	14,5	5,4
Levures	0	0	0	5,3	7
Moisissures et Actinomyces	40	7	3	11,4	9,3

Une détermination approximative de la radiorésistance de ces contaminants fut également effectuée (irradiation à 2,5 Mrads des souches isolées).

De l'ensemble des résultats, les auteurs ont conclu qu'une dose de 2,5 Mrads est suffisante si le taux de contamination ne dépasse pas 500 germes par article.

Osterberg (245) a réalisé une étude détaillée sur la contamination initiale de différents types de sutures (catgut et sutures en soie, polyester ou nylon) prélevées dans la fabrication normale, ou bien contaminées par des manipulations répétées. 2980 catguts dans un emballage contenant une solution d'alcool isopropylique ont été contrôlés. Le nombre moyen de contaminants par catgut était de 21 germes pour la production normale et de 58,1 après contamination volontaire. Le taux le plus élevé trouvé a été de 89.

Les autres sutures étaient emballées à l'état sec. 1787 sutures ont été examinées. Le nombre moyen de contaminants était de 14,3 et 93,9 après manipulations répétées. Le taux maximum obtenu par suture a été de 400.

Pour la 2ème catégorie de matériel, le nombre élevé de contaminants après manipulations pouvait s'expliquer par le fait que les forces électrostatiques du matériel synthétique retiennent les contaminants des mains du personnel.

La distribution des 11454 contaminants, dans les différents groupes de microorganismes, était la suivante :

Type de Sutures	Nombre de colonies examinées	%			
		Levures	Moisis- sures	Bactéries sporulées	Autres types de bactéries
Suture en soie	4286	73,3	7,7	9,2	9,8
" polyester	2833	87,2	2,8	+	3
" nylon	612	77,6	5,2	8,3	8,8
catgut	3723	59	1,1	19,9	19,8

Dans un deuxième temps (246) la radiosensibilité des contaminants a été déterminée. Les membranes de filtration après numérations ont été exposées à 1,5 Mrad. Les microorganismes ayant survécu à cette dose ont été repris et leurs courbes d'inactivation ont été déterminées avec des suspensions desséchées sur des petites feuilles de polyéthylène.

Au total, 653 membranes supportant 18 748 colonies ont été exposées à 1,5 Mrad. 152 colonies correspondant à 12 souches différentes ont donné des survivants. Parmi ces 12 souches, 2 étaient des levures, 9 des bacilles Gram + dont 6 sporulés et 1 un Micrococcus ; toutes sauf une possédaient un pigment rose ou rouge.

Le plus résistant était le Micrococcus (D10 environ 700 Kds), 6 colonies de ce type ont été isolées représentant 0,03 % du nombre total des colonies examinées.

En fonction de la fréquence d'isolement des souches résistantes, la dose requise pour avoir une marge de sécurité de 1 survivant pour 10^6 articles a été calculée. Cette dose est de 2,5 Mrads, si le nombre moyen de contaminant par suture ne dépasse pas 10.

En conclusion, il apparaît que le nombre de contaminants par article est assez faible puisque dans la majorité des cas, il est inférieur à 100. Cependant, dans certains cas, des taux plus élevés sont trouvés et en particulier lorsque les objets sont soumis à des contacts manuels.

Dans l'ensemble, les contaminants les plus fréquents sont les cocci Gram positif (Staphylococci - Micrococci) suivis des bacilles sporulés. Mais, dans un certain nombre de cas les levures et champignons sont également fréquents et parfois même prédominants. Aucun auteur n'a rapporté l'isolement de Streptococcus faecium.

VI.3.4. - Contrôles microbiologiques après irradiation

VI.3.4.1. - Tests de stérilité

La plupart des Pharmacopées imposent un contrôle de la technique de stérilisation au moyen de tests de stérilité. Or, la sensibilité de ces tests a été fortement discutée ces dernières années (76). En effet, ces tests (même s'ils sont conformes aux recommandations de l'O.M.S.) ne permettent de détecter que des contaminations importantes.

En 1963, au "Council of the Pharmaceutical Society of Great-Britain", il a été montré que, avec le nombre d'échantillons qui peuvent être prélevés dans un lot sans augmenter les coûts de façon non réaliste, les tests de stérilité conventionnels peuvent seulement mettre en évidence une contamination de 10 %. Lorsque la contamination est inférieure à 10 %, la probabilité pour que les tests soient négatifs est importante.

VI.3.4.2. - Indicateurs microbiologiques

Depuis longtemps, des indicateurs biologiques sont utilisés pour les contrôles de la stérilisation par la vapeur d'eau et par la chaleur sèche. Les premiers indicateurs furent des indicateurs naturels tels que des échantillons de terre. Par la suite des préparations standardisées, c'est à dire des échantillons artificiellement contaminés par un nombre connu de spores bactériennes furent utilisées. Des souches bactériennes furent sélectionnées en raison de leur grande résistance au procédé de stérilisation (B. stearothermophilus pour la chaleur humide, B. subtilis pour la chaleur sèche).

Pour la radiostérilisation, des indicateurs microbiologiques sont également utilisés. En effet, le "Code of Practice" publié en 1967 sous l'égide de l'I.A.E.A. (178) recommande l'utilisation de standards microbiologiques pour mesurer l'efficacité des différentes installations. Ces préparations sont utilisées également pour des contrôles de routine. En effet, les tests de stérilité conventionnels ne sont pas adéquats pour ce contrôle, puisque dans le cas où la marge de sécurité est de 1 pour 10^6 , il faudrait contrôler un million d'articles pour confirmer qu'il reste un germe survivant.

Trois microorganismes ont été acceptés comme germes-tests :

- Streptococcus faecium A₂¹
- Bacillus pumilus E 601
- Coliphage T1

Mais, peu de temps après la publication du code, un mutant de B. sphaericus, très radiorésistant fut isolé par Christensen et Collaborateurs (78). Cette souche (B. sphaericus C, A) fut donc retenue également comme germe test.

Les indicateurs sont habituellement préparés selon la technique de Christensen (67 - 68) ; un volume de suspension bactérienne en bouillon sérum contenant environ 10^8 germes est déposée sur des petits supports en plastique. Après dessiccation dans une hotte à flux laminaire, ce support est mis sous double emballage thermoscellé.

Les laboratoires de référence qui préparent ces indicateurs déterminent les courbes d'inactivation pour chaque lot. Les courbes d'inactivation habituellement obtenues sont portées dans la figure n° 20, page 220).

La D10 de B. pumilus E 601 est d'environ 0,3 Mrad, celle de B. sphaericus C₁A de 0,8 à 1 Mrad.

Les indicateurs de St. faecium posent quelques problèmes (76). La radiorésistance est influencée par le débit de dose (122). En effet, l'efficacité est de 10 à 12 % plus élevée pour les rayons γ que pour les flux d'électrons.

D'autre part, les conditions de préparation modifient également la radiorésistance, en particulier l'humidité de l'atmosphère.

Benazet et Collaborateurs (37) ont toujours obtenu des indicateurs de S. faecium plus radiosensibles que ceux préparés dans le laboratoire de Christensen, alors que les conditions de préparation étaient strictement identiques. Enfin, troisième inconvénient, la durée de conservation est limitée à 6 à 8 semaines (76).

Il semble donc que les indicateurs préparés avec des spores bactériennes soient plus maniables et donnent une meilleure reproductibilité. Les indicateurs sont utilisés dans deux buts :

- Contrôle de l'efficacité microbiologique de l'installation d'irradiation. Dans ce cas, les indicateurs sont irradiés à différentes doses (3 minimum). Les échantillons irradiés et les échantillons témoins sont ensuite numérisés par mise en suspension dans un volume déterminé de soluté physiologique, dilutions successives et étalement d'une fraction aliquote sur des boîtes de gélose. Après incubation, les colonies sont comptées.

La courbe doses-survivants est ensuite construite et comparée à celle de la courbe de référence.

Emborg et Collaborateurs (69), Benazet et Collaborateurs (37), Horakova (167) ont rapporté leurs expériences sur l'utilisation de ces indicateurs pour ce type de contrôle.

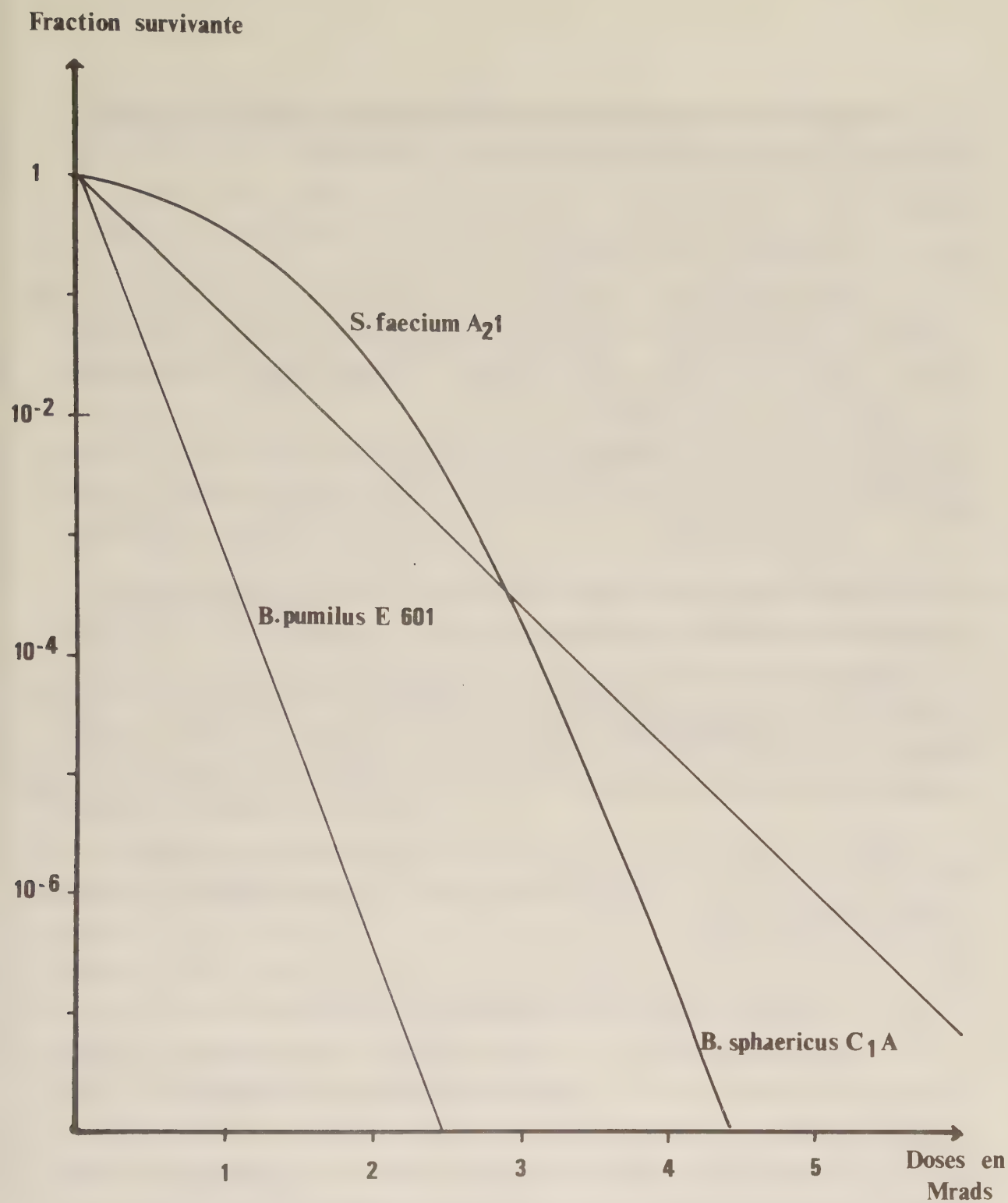


Figure 20 : COURBES D'INACTIVATION DES GERMES TESTS UTILISES
POUR LES CONTROLES DE LA RADIOSTERILISATION

D'après CHRISTENSEN (78)

- Contrôles de routine de la procédure de radiostérilisation,
donc en fait de la marge de sécurité. Dans ce cas, deux techniques
peuvent être utilisées :

* Méthode du tout ou rien

Ces indicateurs sont placés convenablement dans le lot à stériliser. Après irradiation, ils sont transférés dans un tube contenant un bouillon de culture. L'absence de développement indique que la stérilisation est adéquate.

Des indicateurs de B. pumilus E 601 sont utilisés de cette façon aux Etats-Unis (26), en Angleterre et en France pour un contrôle à 2,5 Mrads. Mais B. pumilus ne peut servir pour des doses plus élevées. Pour des doses supérieures à 2,5 Mrads, les Danois (78, 123) ont mis au point des indicateurs avec des mutants de Bacillus cereus qui permettent de faire des contrôles du tout ou rien entre 2 et 6 Mrads.

Horakova (167) a rapporté l'utilisation en Tchécoslovaquie d'indicateurs de B. sphaericus chargés à 10^6 spores, utilisables pour un contrôle du tout ou rien à 2,5 Mrads (ces indicateurs ne sont pas préparés avec du bouillon sérum et la D10 est donc inférieure à 0,8 Mrad).

Cette technique du tout ou rien est uniquement qualitative. En effet, si la dose a été insuffisante, on ne sait pas quel est le facteur d'inactivation réel.

* Contrôle par numération des survivants.

Après irradiation à la dose choisie, les survivants sont numérés. En se reportant à la courbe d'inactivation de référence, on peut ensuite calculer le facteur d'inactivation obtenu. Cette technique est donc la plus précise. A part les indicateurs de St. faecium dont la conservation est limitée, tous les autres peuvent être utilisés pour ce type de contrôle (les indicateurs de B. pumilus doivent avoir un nombre de spores supérieur à 10^8).

VI.3.4.3. - Autres méthodes de contrôles

Le "Code of practice" recommande d'utiliser pour les contrôles de routine des objets délibérément exposés à la contamination maximum

pouvant se produire lors de la fabrication et de vérifier que la stérilisation a été effective.

Enfin, une méthode de contrôle plus sophistiquée a été récemment proposée par Tallentire et Collaborateurs (317). Les tests de stérilité classiques ont, selon les auteurs, deux défauts majeurs, manque de sensibilité d'une part et fréquence non négligeable de faux positifs d'autre part. D'après les auteurs, lorsqu'on examine un lot d'articles sûrement stériles (irradiés par exemple à 10 Mrads), avec les meilleures conditions de contrôle la fréquence de ces faux positifs est de 1 pour 10^3 . Ceci implique que les tests de stérilité ne peuvent être valablement utilisés que si la proportion d'objets contaminés est supérieure à $1/10^3$.

Les auteurs proposent donc une méthode de contrôle basée sur l'examen de la contamination d'un certain nombre d'articles irradiés à différentes doses, toujours inférieures aux doses stérilisantes, la dose maximum D_m correspondant à une proportion d'objets contaminés (P) égale à $1/10^3$. La courbe P en fonction de la dose est ensuite tracée ; par extrapolation jusqu'à la dose stérilisante choisie; on peut en déduire la marge de sécurité.

Dans un premier temps (317) les auteurs ont mis au point des modèles mathématiques pour étudier l'influence des différents paramètres (nombre initial de contaminants, radiorésistances de ces contaminants et forme de leurs courbes d'inactivation). Ils en ont conclu que leur technique était valable sauf dans le cas où il y a un nombre de contaminants radiorésistants très faible par rapport au nombre de contaminants plus sensibles.

En effet, dans ce cas, la courbe P en fonction de D subit un changement de pente à partir de doses qui sont supérieures à D_m .

Dans un deuxième temps, les auteurs ont expérimenté leur méthode de contrôle (214) sur des seringues à usage unique prélevées dans la production de 3 firmes. Il est apparu que cette technique pouvait être utilisée pour des contrôles de routine. Enfin, la validité de leur modèle mathématique a été vérifiée (319) avec des échantillons artificiellement contaminés par du B. pumilus E 601. Les premiers résultats expérimentaux concordent avec les données théoriques calculées à partir du modèle mathématique.

En conclusion, deux types de contrôles microbiologiques du matériel à usage unique sont régulièrement utilisés : les tests de stérilité et les indicateurs biologiques. Ces derniers fournissent des informations précises, alors que les tests de stérilité conventionnels n'ont un intérêt que pour la détection d'une contamination massive et accidentelle.

VI.3.5. - "Code of Practice"

Le besoin d'une législation pour l'utilisation de la radiostérilisation s'est fait sentir dès 1960. En 1966, l'I.A.E.A. a réuni un groupe d'experts qui publia ses résultats en 1967 (178).

Le code donne des recommandations et a été considéré comme un document de référence, et non pas comme un texte ayant force de loi.

Les recommandations de ce code sont les suivantes :

1) Les produits destinés à être radiostérilisés doivent être fabriqués dans de bonnes conditions d'hygiène. Les locaux doivent être ventilés avec de l'air propre et nettoyés régulièrement. Le personnel doit être informé de la façon dont les contaminations peuvent se produire. Des personnes qualifiées doivent vérifier que ces règles sont bien appliquées.

2) Les articles doivent être manipulés le moins possible. Ils doivent être emballés de façon que la stérilité soit maintenue. Les articles stériles et non stériles doivent être rapidement identifiables et doivent être entreposés dans des locaux séparés.

3) Contrôles microbiologiques d'efficacité.

L'efficacité de l'installation doit être testée au moyen d'étalons microbiologiques de référence.

4) Choix de la dose

La dose minimum n'est pas indiquée, elle dépend du matériel à stériliser, de la contamination initiale et de la marge de sécurité requise selon le type de matériel. La contamination initiale doit être étudiée par des examens quantitatifs et qualitatifs de la flore bactérienne d'articles, prélevés au hasard en fin de fabrication juste avant l'irradiation. Dans une production en continu, la contamination moyenne doit être calculée sur la base des résultats du jour et des 9 jours

précédents. La marge de sécurité peut être vérifiée par exposition à la stérilisation d'indicateurs biologiques ou d'articles délibérément contaminés. Après traitement, ils doivent être stériles.

La dose minimum calculée dépend de la contamination initiale et donc du facteur minimum d'inactivation choisi par les autorités compétentes. Ce facteur d'inactivation peut être de 10^5 pour certains produits, mais pour du matériel en contact avec le sang un facteur de 10^8 semble nécessaire (un tel facteur d'inactivation donne une marge de sécurité d'environ 1 germe viable pour 10^6 bactéries).

Lorsque le taux de contamination initial et le facteur d'inactivation ont été pris en considération pour le choix de la dose, les tests de stérilité conventionnels ne sont pas nécessaires.

5) Contrôle des installations d'irradiation :

Ces installations doivent être conformes aux exigences réglementaires nationales. La dosimétrie doit être effectuée avec des méthodes reconnues. Le code indique les différentes méthodes utilisables et précise les conditions de leur emploi.

Si les contrôles des conditions d'hygiène de la fabrication ont été unanimement admis, par contre certaines recommandations de ce code ont été vivement critiquées. Les contrôles de routine sur la contamination initiale qui doivent être effectués sur la production du jour et des neuf jours précédents, semblent pour certains irréalisables en pratique courante (Artandi, 343). D'autre part, l'exigence d'un facteur d'inactivation de 10^8 est jugée excessive pour certains (Bonet-Maury, 43, Benazet, 37).

En 1972, une conférence a eu lieu pour faire le point sur l'utilisation du "Code of Practice" (185).

Enfin, un nouveau texte a été mis au point en 1973 et présenté au Congrès de Bombay (186). Ces nouvelles recommandations sont moins strictes et précises que les précédentes, elles insistent surtout sur les conditions d'hygiène de la fabrication qui doivent être en accord avec le "Code of manufacturing practice" publié par l'O.M.S. (WHO Technical report series, n° 48, Annex 2, 1969).

VI.3.6. - Différentes législations nationales.

Les Pharmacopées nationales n'ont pas toutes adopté les prescriptions du "Code of practice" de 1967.

Il existe trois types de législation (93) :

- Type 1 : c'est la plus simple.

Ce type de législation exige seulement que le fabricant prouve que ses produits sont stériles au moyen des tests de stérilité conventionnels. Il n'y a pas de marge de sécurité imposée.

- Type 2 :

Les législations indiquent habituellement la dose minimum, le plus souvent 2,5 Mrads. Il est rarement fait mention d'une marge de sécurité précise, mais des contrôles de fabrication, de la contamination initiale et des tests au moyen d'indicateurs biologiques sont imposés.

- Type 3 :

C'est le type de la législation Danoise, qui impose une marge de sécurité de 1 survivant pour un million d'articles. La dose est calculée en fonction de la contamination initiale en estimant que tous les contaminants ont une radiorésistance égale à celle de S. faecium A₂¹.

En France, il n'existait aucune législation particulière jusqu'en 1974. Mais à cette date, une monographie sur la stérilisation par les rayons ionisants de matériel médico-chirurgical à usage unique a été introduite dans la Pharmacopée française (Additif n° 4, JO 2 juin 1974) .

Cette monographie peut être résumée ainsi :

Les étapes de la fabrication doivent être conduites de manière à limiter la contamination (contrôles d'air, règles d'hygiène personnelle et de travail).

La contamination en fin de fabrication doit être étudiée quantitativement et qualitativement.

Une dose minimale de 2,5 Mrads est estimée suffisante si les articles sont fabriqués dans le respect des règles précédentes et si la contamination initiale est inférieure au maximum tolérable, compte tenu de la radiosensibilité des contaminants. Le maximum tolérable sera précisé dans des monographies particulières, à défaut il est déterminé lors d'études préalables. Des règles sont données pour la conduite de l'irradiation en particulier la dosimétrie.

Après irradiation, un contrôle microbiologique d'efficacité doit être effectué avec des indicateurs microbiologiques de B. pumilus E 601 et B. sphaericus C₁A contaminés par 10^8 spores. Dans le cas d'une irradiation à 2,5 Mrads, les indicateurs de B. pumilus doivent être stériles, pour B. sphaericus un facteur d'inactivation d'environ 10^3 doit être obtenu.

VI.4. - Radiostérilisation des produits pharmaceutiques

Très tôt, il est apparu qu'il pouvait être intéressant d'utiliser la stérilisation par les radiations ionisantes pour les médicaments en raison des avantages suivants : possibilité de stériliser des substances thermosensibles, stérilisation dans l'emballage définitif.

Mais des difficultés ont surgi, dues aux modifications chimiques et physiques qui peuvent se produire sous rayonnement. De nombreuses études ont été réalisées afin de savoir quelles sont les substances ou les formes pharmaceutiques qui peuvent être radiostérilisées. Lors des Symposiums organisés en 1967 et 1974 par l'I.A.E.A. (178 - 186), des publications ont été consacrées à ce sujet. Une revue générale de Phillips figure dans le manuel sur la radiostérilisation publié par l'I.A.E.A. en 1973 (252).

VI.4.1. - Antibiotiques

Controulis et Collaborateurs (83) en 1954 ont testé, après irradiation à 1,8 Mrad, l'activité biologique de 5 antibiotiques : Pénicilline G, Chlorhydrate de Streptomycine, Auréomycine, Terramycine et Chloromycétine. L'activité antibiotique était parfaitement conservée. Aucun changement de solubilité n'a été observé par contre un léger changement de couleur de la Streptomycine et de la Chloromycétine a été noté.

En 1957, Grainger et Hutchinson (152) ont irradié de la Pénicilline G en solution aqueuse et à l'état sec à la dose de 1 et 2 Mrads, sans observer de perte d'activité. Colovos et Churchill (81) ont obtenu des résultats similaires après irradiation à 2.10^6 Rep de différentes formes de Pénicilline G; par contre pour des doses supérieures (jusqu'à 20.10^6 Rep) il y a inactivation par modification de la molécule, avec parallèlement apparition de phénomènes de toxicité.

Aucune perte d'activité n'a été observée en 1956 par Horne (169) après irradiation à l'état sec à 2 Mrads de Pénicilline G, de

Streptomycine, de Chloramphénicol et de Chlortétracycline ; cependant de légers changements de couleur ont été notés. Le même auteur, en 1958 (170) a irradié, le plus souvent à l'état sec, différentes formes de Pénicilline, Streptomycine, Néomycine, Polymyxine et Bacitracine. L'activité était conservée à 2,5 Mrads malgré quelques changements de couleur. A la dose de 25 Mrads, la coloration était plus marquée, mais la perte d'activité était très faible.

Holland et Coll. (166) ont étudié la tenue sous rayonnement de 3 Tétracyclines : Oxytétracycline, Chlortétracycline et Pyrrolidine-méthyl-tétracycline. Ces trois produits irradiés en solutions aqueuses perdent toute activité antibiotique à partir de 0,25 à 0,30 Mrad, des modifications importantes du spectre UV sont observées et l'apparition de corps nouveaux est décelable par chromatographie en couche mince. Par contre, ces trois Tétracyclines conservent leur activité antibiotique lorsque l'irradiation est faite à l'état sec à des doses de 5 et 10 Mrads ; il y a cependant production de radicaux libres.

L'irradiation de préparations pour usage ophtalmique a été également étudiée. Une solution de Framycétine irradiée à 2,5 Mrads a été testée par Ogg (243). La solution devenue légèrement acide n'avait perdu que faiblement son activité. L'utilisation de cette solution dans 200 cas cliniques n'a entraîné aucun signe de toxicité.

Hangay et Coll. (157) ont irradié à 2,5 et 5 Mrads une pommade à l'acétate d'hydrocortisone et au Chloramphénicol ainsi que les différents ingrédients séparément. Le produit fini n'a pas subi de changements importants. Le Chloramphénicol avait une coloration jaune plus marquée, la perte d'activité était nulle, mais des radicaux libres ont été mis en évidence après une dose de 2,5 Mrads.

Fleurette et Coll. (127bis) ont étudié après irradiation, l'activité antimicrobienne de 33 produits différents appartenant aux différentes familles des antibiotiques antibactériens et antifongiques. Irradiés à l'état sec, 4 antibiotiques seulement ont subi une légère perte d'activité à 2,5 Mrads (Céphalotine, Tobramycine, Virginiamycine, Pristinamycine) ; entre 5 et 10 Mrads une perte d'activité modérée a été observée pour 15 autres antibiotiques (Oxacilline, Kanamycine, Acide fusidique, Streptomycine, Pénicilline, Néomycine, Paromomycine, Soframycine, Oléandomycine, Rifampicine, Méthicilline, Métampicilline,

Trimethoprime-Sulfamethoxazole, Vancomycine, 5 fluoro-cytosine) ; enfin l'activité était totalement conservée à 10 Mrads pour les 14 antibiotiques restant (Ampicilline, Carbénicilline, Ticarcilline, Céfalexoridine, Gentamicine, Tétracycline, Minocycline, Colistine, Erythromycine, Lincomycine, Chloramphénicol, Nitrofurantoïne, Acide Nalidixique, Amphotéricine B).

Par contre, en solution aqueuse, la perte d'activité était totale à 2,5 Mrads pour tous les antibiotiques, sauf deux.

Gopal et Coll. (149) ont irradié des sels de Pénicilline G et d'Ampicilline et une pommade ophtalmologique contenant du chlorure de Tétracycline. Pénicilline et Ampicilline irradiées à l'état sec ont été trouvées conformes aux spécifications de la Pharmacopée Indienne à l'exception d'une légère coloration jaune. Aucune modification n'a été mise en évidence par spectrophotométrie en UV et chromatographie en couche mince. Après irradiation à 2,5 Mrads, la pommade à la Tétracycline (1 % dans de la paraffine) avait une absorption en UV légèrement abaissée.

Kulkarni et Gopal (205) ont réalisé des tests pharmacologiques et de tolérance avec cette pommade ainsi que deux autres contenant de la Pénicilline et du Chloramphénicol. L'efficacité était conservée et les tests de tolérance locale chez le lapin n'ont mis en évidence aucune toxicité.

Les antibiotiques en solution sont donc fortement inactivés par irradiation. Phillips (252), Blackburn et Coll. (41) ont montré que cela était dû aux radicaux libres produits par radiolyse de l'eau et ont étudié les mécanismes en cause.

Par contre, la stérilisation par irradiation des antibiotiques à l'état sec ou de préparations antibiotiques telles que les pommades semble possible, cependant des études pharmacologiques et toxicologiques sont encore nécessaires, avant de passer à l'utilisation clinique.

VI.4.2. - Vitamines

Colovos et Churchill (81) ont irradié, à l'état sec, 2 mélanges de vitamines avec une dose de 2 Mrads (Thiamine, Riboflavine, Pyridoxine, Panthotenate de calcium et Nicotinamide). Aucune modification de la teneur des différentes vitamines n'a été observée et des essais de toxicité n'ont montré aucune réaction de toxicité aigue chez l'animal.

Ces préparations ont été administrées chez 80 patients et ont été bien tolérées.

La Cyanocobalamine est par contre instable. Une perte d'activité de 90 % a été observée (27) après irradiation à 2,5 Mrads. Un certain nombre d'études ont été réalisées sur les mécanismes impliqués (41 - 252).

L'acide ascorbique est stable à l'état sec jusqu'à 25 Mrads, mais il est inactivé en solution aqueuse diluée (252). Par contre, Controu-lis et Coll. (83) ont montré qu'en solution concentrée (280 mg/ml), la perte d'activité est très faible à 1,9 Mrads.

L'effet de l'irradiation gamma sur la vitamine B6 et l'acide fo-lique a été étudié par Galatzeanu et Antoni (138). Ces deux substan-ces irradiées en solution aqueuse sont partiellement ou totalement dé-truites selon la dose (destruction totale à 2,5 Mrads).

Les produits de radiolyse ont été identifiés par chromatographie en couche mince et électrophorèse sur colonne de cellulose.

L'irradiation à l'état sec de la pyridoxine et de l'acide folique entraîne la formation de radicaux libres par élimination d'atomes d'hy-drogène ; mais après dissolution dans des solutions aqueuses, la res-tauration des molécules est observée, si bien qu'il est possible de radiostériliser à l'état sec ces deux vitamines avec une dose de 2 Mrads.

Calciferol et ergosterol sont stables jusqu'à 6 - 18 Mrads, en absence d'air alors qu'en présence d'oxygène, une inactivation de 15 % a été observée (252).

VI.4.3. - Hormones stéroïdiennes

En 1958, Horne (170) a montré que la progesterone irradiée à l'état sec résistait bien puisque l'activité est conservée jusqu'à 25 Mrads. A cette dose, ce produit prend une coloration jaune.

Tarpley (cité par Phillips, 252) a irradié deux hormones stéroï-diennes, acétate de pregnenolone et acétate de cortisone ; l'activité est totalement conservée après irradiation à 6 Mrads pour la pregneno-lone et 12,7 Mrads pour la cortisone. Un léger abaissement du point de fusion a été observé. La testosterone est stable jusqu'à 1,1 Mrads (252).

Hortobagyi et Coll. (171) ont irradié à l'état sec, différentes hormones stéroïdiennes. Avec une dose de 2,5 Mrads, des modifications

de la couleur, des propriétés organoleptiques ont été notées ; les modifications physico-chimiques ont été étudiées par absorption en UV, spectrophotométrie infra-rouge, chromatographie sur papier et en couche mince.

Aucune modification n'a été observée pour le benzoate d'oestradiol et la dipropionate de Stilboestrol qui sont donc radiostérilisables avec une dose de 2,5 Mrads. L'acétate de désoxycortisone est très légèrement altéré (légère décomposition mise en évidence par chromatographie en couche mince, mais aucune modification du spectre UV et IR).

La progesterone prend une coloration jaune après irradiation, mais les spectres UV et IR et les analyses chromatographiques sont inchangées.

Pour l'hydrocortisone, les spectres IR et UV ne sont pas modifiés, mais une légère décomposition est mise en évidence par chromatographie sur couche mince.

Comme nous l'avions précédemment cité Hangay et Coll. (156) ont étudié l'effet de l'irradiation sur une pommade ophtalmique contenant de l'acétate d'hydrocortisone. Après application de 2,5 et 5 Mrads des analyses ont été faites par spectrophotométrie UV et IR, chromatographies sur papier et en couche mince, résonance électronique paramagnétique, mesures de pH et essais biologiques. Malgré un changement de coloration, aucune décomposition n'a été observée, et les auteurs pensent qu'une stérilisation par irradiation est applicable à ce produit.

Gopal et Coll. (149) ont étudié les modifications éventuelles de l'acétate d'hydrocortisone irradié à 2,5 Mrads à l'état sec. Les mesures des spectres d'absorption en UV, la chromatographie en couche mince n'ont montré aucune modification. Des études similaires ont été conduites sur de l'acétate d'hydrocortisone extrait d'échantillons de pommade témoins et irradiés ; aucune décomposition n'a été mise en évidence.

Phillips (252) a rapporté les différentes modifications qui se produisent lorsque les stéroïdes sont irradiés en solution aqueuse. Pour la cortisone, on observe une réduction du groupe Δ 4 - 3-oxo avec apparition de dérivés 3 hydroxy, puis addition d'un groupe hydroxyle et d'un atome d'hydrogène sur la double liaison. Pour la désoxycortisone, il y a deshydroxylation de l'hydroxyle en 17 ou en 2.

Donc, comme la plupart des produits pharmaceutiques les hormones stéroïdiennes sont dégradées lorsqu'elles sont irradiées en solutions

aqueuses. Par contre, à l'état sec la stabilité est bonne et la radio-stérilisation semble pouvoir être utilisée.

VI.4.4. - Hormones protéiques

Elles sont dans l'ensemble rapidement dégradées.

Horne (170) a montré que l'activité après irradiation à 2,5 Mrads était réduite à 2,5 % pour l'insuline et à 10 % pour l'insuline protamine zine.

Controulis et Coll. (83) ont observé une dégradation importante des hormones hypophysaires.

Par contre, les hormones thyroïdiennes sont plus résistantes. En effet, Hangay et Coll. (157) ont montré qu'une dose de 2 Mrads n'entraîne aucune modification du produit.

VI.4.5. - Alcaloïdes :

Horne (170) a étudié la stabilité de 3 alcaloïdes : sulfate de morphine, sulfate d'atropine, maleate d'ergométrine. En solution, le sulfate d'atropine est complètement dégradé à la dose de 2,5 Mrads. Le sulfate de morphine est par contre plus stable puisque aucune diminution d'activité n'est mise en évidence lorsqu'il est irradié en solution (1,5 % dans de l'eau).

A l'état sec, une très légère diminution du titre en morphine anhydre est observée (2 % à 2,5 Mrads et 2,5 % à 25 Mrads).

Après irradiation du sel ou de la solution, une coloration apparaît : jaune pâle à 2,5 Mrads et jaune plus marqué à 25 Mrads. De même, un changement de coloration se produit avec l'Ergometrine. A l'état sec, après une dose de 25 Mrads, ce produit n'est pratiquement pas dégradé. Par contre, en solution (0,125 mg/ml) seulement 10 à 20 % de l'activité persiste après une dose de 2,5 Mrads.

Pandula et Coll. (249) ont également étudié les effets de l'irradiation sur l'atropine et la morphine en solution. Des modifications de la couleur, du pH, des spectres UV et de la chromatographie en couche mince ont été observées pour l'atropine en solution à 0,1 %; la dégradation augmente lorsque la dose varie de 0,5 à 3 Mrads (20,5 à 70,5 %). Mais la dégradation diminue lorsque la concentration en atropine augmente.

Pour la morphine, l'absorption en UV est peu modifiée par irradiation, mais des modifications sont mises en évidence par chromatographie en couche mince. Cependant, les différentes méthodes colorimétriques n'ont montré aucune diminution de la teneur en morphine avec 2,5 Mrads.

Gopal et Coll. (149) ont examiné la stabilité de chlorure d'éthyl-morphine après irradiation à 2,5 et 5 Mrads. A part une légère modification de la coloration, le produit a été trouvé conforme aux prescriptions de la Pharmacopée Indienne.

Kulkarni et Gopal (205) ont montré que de la poudre de Rauwolfia irradiée à 2,5 Mrads, avait une teneur en alcaloïde inchangée et un pouvoir hypotenseur intact (essais chez le chien).

Enfin, la caféine, le chlorure d'emetine, les bisulfates de spartéine et de strychnine irradiés à l'état sec, à 2,5 Mrads ne sont pas dégradés (Bonet-Maury cité par Phillips ,252).

VI.4.6. - Anesthésiques locaux

L'hydrochlorure de Procaine conserve son activité après irradiation à l'état sec à 2,5 et 25 Mrads (329). En solution à 2,5 % une dose de 2,5 Mrads n'entraîne aucune modification du spectre UV et IR (309).

Pandula et Coll. (249) n'ont mis en évidence aucune modification du spectre UV et de la chromatographie en couche mince après irradiation à 2,5 Mrads d'une solution de Lidocaïne à 2 %.

VI.4.7. - Excipients

"L'Association of British Pharmaceutical Industry" (27) a rapporté une expérience d'irradiation de paraffine solide à 2,5 Mrads. Un dégagement gazeux important a été observé après irradiation à 25 Mrads. Par contre, Hangay et Coll. (156) et Gopal et Coll. (149) ont obtenu des résultats satisfaisants après irradiation à 2,5 Mrads de paraffine liquide ou solide.

Hangay et Coll. (156) ont également étudié l'effet de l'irradiation sur l'alcool cetylique, le propylèneglycol et l'éther de pétrole. Le premier supporte bien l'irradiation ; l'éther de pétrole est décoloré, mais la radiostérilisation est utilisable. Le propylèneglycol est légèrement décomposé.

La carboxyméthyl cellulose est rapidement dégradée avec réduction de viscosité observable après une dose de 5,7 Krads (Phillips 252).

VI.4.8. - Substances diverses

Plusieurs études sur l'irradiation des organomercuriels ont été réalisées. Le "Mersalyl" irradié à 2,5 Mrads, à l'état sec, devient jaune et du mercure libre est libéré (Horne, 170).

Gopal et Collaborateurs (149) n'ont mis en évidence aucune décomposition du nitrate de phénylmercure irradié à l'état sec jusqu'à 2,5 Mrads. Par contre, en solution aqueuse à 0,005 %, 90 % du produit est dégradé à 2,5 Mrads.

La fluoresceine de sodium, soit en solution, soit sous forme de bandettes de papier imprégnées peut être stérilisée par rayonnement gamma (149 - 252). De même l'urée à l'état sec supporte bien une irradiation à 2,5 Mrads puisque aucune augmentation de la teneur en biuret n'a été notée (149).

VI.4.9. - Plasma, protéines sanguines et anatoxines

La radiostérilisation de différentes protéines sanguines ou de plasma total a fait également l'objet d'un certain nombre de travaux. Dès 1957, Colovos et Churchill (81) avaient réalisé des essais avec du plasma humain lyophilisé. Des analyses électrophorétiques n'ont montré aucune modification de la composition après irradiation à 1.10^6 Rep. Par contre à 2 Mrads, des modifications ont été observées.

Antoni et Collaborateurs (21) ont irradié du plasma lyophilisé à des doses comprises entre 0,5 et 15 Mrads. Aucune différence de solubilité n'a été notée, par contre, des modifications du spectre d'absorption entre 255 et 280 nm ont été observées après irradiation entre 0,5 et 1,5 Mrad. Le plasma irradié à 10 Mrads, puis réhydraté avait une viscosité augmentée. Le temps de coagulation était augmenté après irradiation à 0,5 Mrads.

Lopez Martinez et Crespocortina (221) ont irradié à 2 - 2,5 Mrads et 3 Mrads du plasma entier et des fractions plasmatiques telles que : fibrinogène, Gamma globuline et albumine. Toutes ces substances ont été irradiées sous forme lyophilisée.

Lorsque la teneur en humidité est inférieure à 0,05 %, les résultats sont satisfaisants car les modifications physico-chimiques sont faibles ;

Les facteurs de la coagulation comme la prothrombine, les facteurs Stuart et Hageman ne sont pas modifiés.

Des échantillons de plasma contaminés artificiellement avec des bactéries sporulées ou non et du virus de l'hépatite infectieuse étaient stériles après irradiation à 2,5 - 3 Mrads.

Les effets de l'irradiation sur les Gamma globulines et les anatoxines ont également été étudiés. Gergely et Collaborateurs (139), ont irradié à 1,5 ou 2,5 Mrads des immunoglobulines G humaines (IgG) lyophilisées. Les préparations testées étaient soit des IgG anti-rhésus, soit des IgG extraites de sérums humains normaux.

Les IgG irradiées avaient des mobilités électrophorétiques et des activités anticorps identiques à celles des témoins non irradiés (anticorps anti-staphylotoxine α pour les IgG de sérums humains normaux). Cependant, la filtration sur gel de Séphadex a montré la présence de molécules protéiques agrégées.

De Saint Aubert et Collaborateurs (286) ont étudié la stabilité sous irradiation de sérum antitétanique purifié et de Gamma globulines polyvalentes en solution. L'irradiation entraîne une diminution du titre du sérum antitétanique proportionnelle à la dose ; des modifications de l'immuno-électrophorèse sont observées à partir de 1,5 Mrad. Pour les IgG polyvalentes, la viscosité augmente à partir de 1,5 Mrads ; une dénaturation des protéines est également notée à l'électrophorèse. L'activité antimorbileuse de ces Gamma globulines diminue à partir d'une dose de 1 Mrad.

On peut donc conclure qu'en général les substances pharmaceutiques, irradiées en solution, sont rapidement dégradées, alors qu'à l'état sec la stabilité est meilleure. Les substances protéiques sont parmi les plus sensibles à l'irradiation. Des antibiotiques, des hormones stéroïdiennes, des vitamines et des alcaloïdes sont peu modifiés par une irradiation à 2,5 Mrads et sont donc susceptibles d'être radio-stérilisables. Cependant, les études physico-chimiques doivent être poursuivies afin de connaître de façon précise les modifications qui peuvent se produire. D'autre part, des études toxicologiques sont encore nécessaires avant que l'on puisse envisager une utilisation clinique.

VI.5. - Radiostérilisation de tissus biologiques

Les tissus biologiques utilisés pour des homo ou des hétérogreffes doivent être préparés selon des méthodes qui assurent la stérilité en évitant la détérioration des propriétés fonctionnelles.

La stérilisation par les rayons ionisants est une des méthodes utilisables pour les tissus où la présence de cellules vivantes n'est pas nécessaire, tels que valves cardiaques, parois vasculaires, os, nerfs, etc...

Depuis ces dix dernières années, cette technique a fait l'objet d'un grand nombre de travaux et a été utilisée avec succès. Lors des Symposiums organisés par l'I.A.E.A. (178 - 186) et dans les revues publiées par cet organisme (182 - 184), ce domaine d'application de la radiostérilisation occupe une place importante.

VI.5.1. - Valves cardiaques

Un des inconvénients de l'utilisation de valves prothésiques pour le remplacement de valves cardiaques défectueuses est le risque thromboembolique qui nécessite donc l'institution d'un traitement anticoagulant de longue durée.

Par contre, un tel traitement n'est pas nécessaire lorsque des homogreffes son implantées. C'est pourquoi, depuis 1962 de nombreuses équipes dans le monde ont pratiqué des homogreffes aortiques et actuellement plusieurs milliers de malades ont été opérés avec ce procédé.

Plusieurs techniques de stérilisation ont été utilisées : formol, oxyde d'éthylène, betapropiolactone. Ces méthodes sont actuellement abandonnées, car elles entraînent des lésions valvulaires (Ross, 283 Malm 228 , Castany 63 , Gibbons 143). En effet, l'oxyde d'éthylène à 10 % pendant 4 heures diminue la résistance mécanique de la valve. La Bétapropiolactone modifie également la résistance du tissu, épais- sit les cuspides et diminue de 20 % leur surface.

D'autre part, à ces techniques était souvent associée une conservation par lyophilisation qui s'est avérée avoir également des effets nocifs (228 - 283) avec apparition de calcification ultérieure de la greffe.

Actuellement deux méthodes principales de stérilisation sont utilisées : les solutions d'antibiotiques et la radiostérilisation. Certains auteurs préfèrent la première technique car elle est facile à mettre en oeuvre et permettrait selon certains de conserver la viabilité cellulaire. En fait, elle a l'inconvénient de ne pas garantir la stérilité et Innes et Collaborateurs (176) ont montré que des valves plongées dans une solution de Hanks contenant des antibiotiques voyaient leur endothélium rapidement détruit.

Dès 1967, Gibbons et Alladine (141) ont mis au point une technique de radiostérilisation. Les valves sont prélevées dans les 48 heures suivant le décès du donneur. Après un lavage dans de l'eau distillée, elles sont placées à sec dans un double emballage de polyéthylène et conservées à + 4° C. Des valves expérimentales ont été irradiées à différentes doses de rayonnement Gamma pour déterminer la dose stérilisante. Les valves sont fréquemment contaminées par du *Staphylococcus aureus*, de l'*Escherichia coli*, des *Clostridium* et des champignons. Des survivants ont été encore isolés à des doses de 1, 1,5 et 2 Mrads. Par contre, une expérimentation avec 64 valves ou fragments aortiques a montré que la stérilité était toujours obtenue avec une dose supérieure à 2 Mrads.

Des études histologiques ont également été réalisées par les auteurs. Les valves irradiées jusqu'à 4 Mrads n'ont subi aucune altération de la paroi aortique et des valvules. A partir de 5 Mrads, l'examen au microscope électronique révèle une altération des fibrilles de collagène si l'irradiation est faite en milieu humide. La diffraction par rayons X a confirmé qu'une dégradation partielle se produisait. Les essais mécaniques de résistance n'ont mis en évidence aucun changement jusqu'à 5 Mrads.

Des homogreffes stérilisées par rayonnement Gamma à 2,5 Mrads ou 3 Mrads et conservées à + 4° C ont donc été implantées chez des patients. Les premiers résultats étaient satisfaisants.

En 1970, les mêmes auteurs (142) ont rapporté les résultats de 110 remplacements par des valves radiostérilisées et conservées à température ambiante ou le plus souvent à + 4° ou - 78° C. Les valves ont été implantées telles quelles en position aortique ou après montage sur un anneau de Teflon ou de Dacron pour l'implantation en position mitrale ou tricuspide (21 cas).

Les 110 patients ayant reçu ces valves ont été observés pendant une période allant de 3 mois à 4 ans après l'opération et les résultats cliniques sont satisfaisants. Les auteurs concluent qu'une banque d'homogreffes peut être constituée et que les valves peuvent être conservées à + 4° C ou - 70° C pendant plusieurs mois.

La congélation à - 70 ° C n'est pas nécessaire si les valves sont prélevées dans les 24 heures suivant le décès et irradiées immédiatement puisque les résultats cliniques obtenus dans ces conditions sont les mêmes qu'avec les valves congelées à - 70° C. Pour les implantations en position mitrale ou tricuspide les auteurs pensent qu'un montage sur Dacron est préférable car il supporte bien l'irradiation. Par contre, le Téflon étant dégradé par l'irradiation, le montage doit être effectué après irradiation de la valve. Les premiers résultats de remplacement de valves atrioventriculaires sont encourageants.

Malm et Collaborateurs (228) utilisent également des valves radiostérilisées depuis 1966. En 1969, ils ont publié les résultats cliniques de 50 implantations avec un recul de 2 ans. Les valves aortiques sont prélevées dans des conditions non stériles. Après dissection pour éliminer l'excès de muscles et graisses, elles sont placées dans un double emballage en polyéthylène et congelées à - 70° C, puis elles sont irradiées par un flux d'électrons à la dose de 2 à 2,2 Mrads. Les valves sont ensuite conservées à - 70° C jusqu'à utilisation.

La résistance mécanique de ces valves a été étudiée et s'est montrée identique à celle des valves fraîches ; les auteurs ont trouvé que la stérilisation par irradiation est la seule méthode qui préserve les qualités mécaniques.

Les résultats cliniques obtenus peuvent être comparés favorablement à ceux rapportés après insertion de prothèses. L'absence de traitement anticoagulant est un argument pour l'utilisation d'homogreffes.

Ross et Yacoub (283) ont réalisé en 1969 un bilan des techniques utilisées pour la préparation d'homogreffes. Ils concluent que la stérilisation par rayonnement Gamma ou par flux d'électrons est une des meilleures méthodes et ils préconisent une conservation à - 79° C.

Castany et Collaborateurs (65) ont utilisé une stérilisation des valves cardiaques par flux d'électrons. Les valves sont prélevées dans les 24 heures suivant la mort sur des donneurs qui doivent avoir de

préférence moins de 40 ans. En effet, dès l'âge de 35 - 40 ans, on constate une réduction très marquée de la résistance de la paroi aortique et des feuillets valvulaires. Après dissection et calibration, les valves sont placées sous double emballage et congelées à -70°C . Elle sont ensuite irradiées par un flux d'électrons à une dose de 2 à 2,2 Mrads. Les homogreffes ainsi préparées peuvent être conservées 8 mois.

Wallace et Collaborateurs (347) ont publié en 1971 les résultats comparatifs obtenus avec des valves stérilisées par deux méthodes différentes : stérilisation par Bétapropiolactone et stérilisation par irradiation à -70°C . Cette dernière méthode a donné entière satisfaction.

Young et Collaborateurs ont implanté des homogreffes aortiques chez 52 patients et ont rapporté en 1971 (358) les résultats cliniques obtenus après un recul de 1 an et demi à 4 ans : les 43 premiers patients ont reçu des homogreffes stérilisées par la Bétapropiolactone ; les 9 autres valves ont été stérilisées par rayonnement Gamma à 2,25 Mrads et conservées à -70°C pendant au maximum 6 mois avant l'implantation. Les résultats sont meilleurs que ceux obtenus par implantation de valves prothétiques.

Fleurette et Collaborateurs (127) ont utilisé la stérilisation par rayonnement Gamma pour la constitution d'une banque de valves. Les valves sont prélevées dans des conditions non aseptiques chez des sujets de moins de 60 ans décédés depuis moins de 24 heures ; après dissection, elles sont placées dans un liquide de conservation (milieu de Hanks additionné de plasma humain) et conservées à $+4^{\circ}\text{C}$ jusqu'à ce qu'elles soient irradiées. Après irradiation, elles sont stockées à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant 6 à 8 semaines. Dans un premier temps, une étude de la contamination initiale a été réalisée sur 50 valves expérimentales (valves défectueuses). Des numérations, après broyage ont été effectuées. Pour 15 valves, la numération des germes était nulle. 24 valves avaient un taux de contamination faible n'excédant pas 1000 bactéries par gramme. Les 11 autres valves étaient plus fortement contaminées. Les contaminants ont été identifiés. Sur 63 espèces isolées, 31 étaient des cocci Gram positifs, 20 des Entérobactéries. Une seule souche de bacille Gram positif sporulé anaérobie a été isolée.

Une partie de ces valves a été irradiée à différentes doses (1,5 Mrads à 2,5 Mrads). Quelques cultures étaient positives après irradiation, mais

elles étaient probablement dues à des souillures liées à la manipulation de broyage. Afin d'avoir une marge de sécurité, une dose de 2,5 Mrads a d'abord été choisie pour stériliser les valves de la banque. Les contrôles de stérilité ne sont pas effectués sur les valves elles-mêmes, mais sur un fragment de paroi aortique irradié à part dans les mêmes conditions. Une étude histologique en microscopie électronique a également été entreprise sur des valves irradiées à 2,5 Mrads. L'examen a été fait soit immédiatement après irradiation, soit 4 mois après. Dans les deux cas les fibrilles de collagène étaient intactes.

Ultérieurement, les études sur la contamination initiale et les contrôles de stérilité après irradiation à différentes doses ont été poursuivies avec des valves expérimentales (128). Les résultats ont permis de penser que la dose de stérilisation pouvait être diminuée. Aussi, dans un troisième temps, la dose stérilisante a été abaissée à 1,5 Mrad (333). Des contrôles bactériologiques sont effectués sur deux fragments prélevés sur la paroi juste en dessous de la valvule. L'un de ces fragments permet de déterminer la nature et le taux de contamination microbienne ; l'autre fragment est irradié en même temps que la valvule et est contrôlé après stérilisation. Les contrôles permettent d'utiliser avec sécurité les valves de la banque.

De 1970 à 1974, 57 malades ont reçu une homogreffe radiostérilisée implantée en position aortique ou tricuspидienne (333). Aucune complication infectieuse n'a été observée. Un bon nombre de malades avec un recul de plus de 3 ans ont un jeu valvulaire en parfait état. Par contre, une incompetence valvulaire est apparue dans certains cas, incompetence résultant d'une dégradation de l'homogreffe.

En conclusion, deux éléments jouent un rôle important dans le succès et la longévité des homogreffes valvulaires :

- d'une part, les méthodes de préparation, de stérilisation et de conservation. Récemment Decker (106) a fait une revue des différentes difficultés rencontrées. Actuellement aucune méthode de stérilisation ou de conservation n'est satisfaisante à 100 %, mais la radiostérilisation avec conservation à - 70° C ou + 4° C est une de celles qui donne les meilleurs résultats.

- d'autre part, la technique chirurgicale de mise en place, qui nécessite en particulier une technique de sutures méticuleuse pour que les fonctions mécaniques soient conservées (65 - 106).

VI.5.2. - Radiostérilisation de tissus osseux

Une banque de tissus osseux stérilisés par radiation a été créée en Pologne depuis plusieurs années. En 1967, Ostrowski et Collaborateurs (247) ont décrit l'organisation de cette banque. Les fragments osseux sont prélevés dans un délai de 8 à 72 heures après le décès. Ils sont ensuite lyophilisés. Après lyophilisation, les tubes sont remplis avec de l'azote. Les transplants sont ensuite stérilisés par irradiation Gamma dans un irradiateur au Cobalt 60 ou dans un réacteur nucléaire. La dose appliquée est de $3,3 \pm 0,5$ Mrads. Les contrôles bactériologiques ont toujours montré que cette dose était suffisante pour garantir la stérilité. Après irradiation les fragments d'os compacts sont plus durs et plus cassants que le tissu osseux frais. Cependant les résultats obtenus après greffe sont satisfaisants et les chirurgiens estiment qu'il n'y a aucune différence du temps de consolidation entre les greffes autologues et les greffes avec de l'os irradié. L'influence de la lyophilisation et de la radiostérilisation sur les propriétés antigéniques a été étudiée chez le lapin. Il est apparu que la lyophilisation et la radiostérilisation suppriment l'antigénicité des fragments osseux.

Après 7 ans d'expérience, Ostrowski (248) a publié en 1973 un bilan des observations et des résultats obtenus. Les auteurs recommandent de prélever les échantillons d'os dans un délai n'excédant pas 6 à 8 heures après la mort. L'âge du donneur ne doit pas être supérieur à 60 ans. Les fragments osseux sont ensuite lyophilisés. Il a été montré qu'une déshydratation excessive pouvait être défavorable pour la conservation des propriétés biologiques et mécaniques. Il est certain que la lyophilisation et la radiostérilisation modifient les propriétés mécaniques. Des déterminations quantitatives de ces modifications ont été réalisées. La résistance à la pression est augmentée, par contre, la résistance à la torsion est diminuée. Malgré, ces modifications des propriétés mécaniques, les résultats cliniques sont satisfaisants. La substitution par le tissu osseux de l'hôte est plus lente avec les os compacts radiostérilisés que dans le cas d'autogreffes fraîches, par contre pour les os spongieux les résultats sont similaires entre os radiostérilisés allogènes et os frais autologues.

Les résultats de Buring (61) sont par contre moins favorables. Des fragments d'os longs ont été prélevés chez le lapin. Les échantillons ont d'abord été décalcifiés dans une solution d'acide chlorhydrique 0,6 N,

puis lyophilisés et enfin irradiés à différentes doses (0,5 - 1 - 1,5 - 2 - 3 - 5 et 10 Mrads). Les fragments ont été implantés dans la cavité abdominale de lapins receveurs. Les implants irradiés à 2 Mrads et plus ne montrent aucun signe de formation de nouveau tissu osseux ; une résorption survient, elle augmente en fonction de la dose d'irradiation.

Une étude chimique a mis en évidence une augmentation de la solubilité du collagène et des glycosaminoglycanes. L'électrophorèse et la chromatographie ont montré que l'irradiation entraînait des modifications de la trame collagène.

A l'examen histologique au microscope électronique, il apparaît que l'architecture fibrillaire de la matrice osseuse est modifiée dans les échantillons irradiés à 2 Mrads et plus.

Les résultats ne sont donc pas très favorables, mais il faut préciser que l'expérimentation a été faite avec des os décalcifiés et il est possible que la suppression de la phase minérale ait été un facteur défavorable.

Campbell et Coll. (63) ont obtenu par contre des résultats satisfaisants. Chez l'animal, une étude comparative entre tissus osseux radiostérilisés à 2 Mrads et tissus frais a été réalisée. Le tissu frais donne une réaction inflammatoire importante et l'ostéogénèse est médiocre. Par contre, les implants irradiés n'entraînent aucune réaction inflammatoire, la revascularisation se fait bien et 50 à 60 % de la matrice originale est remplacé par du nouveau tissu osseux. Chez l'homme des cranioplasties ont été réalisées avec des bandes d'os iliaque radiostérilisées, entrecroisées avec des implants autologues et ont donné entière satisfaction.

Triantafyllou (334) a mis au point une banque de tissus osseux radiostérilisés. Les fragments osseux sont prélevés avec un délai maximum de 8 heures après le décès ou l'amputation. Les tissus mous, graisseux ou les fragments de la moelle osseuse sont éliminés. Les implants sont ensuite congelés et lyophilisés puis irradiés à 3,5 Mrads avec une source de rayons Gamma. Ces implants sont conservés à température ambiante pendant une période de 6 mois maximum.

L'auteur a rapporté les résultats cliniques de 104 implantations avec des allogreffes osseuses radiostérilisées qui se répartissaient comme suit :

40 "fusions spinales"

5 interventions pour arthrodèse de la hanche

8 réparations de kystes osseux

12 interventions pour tumeurs bénignes

18 interventions pour pseudoarthrose des os longs

20 interventions diverses.

Dans un seul cas, une réaction de rejet a été observée. Les résultats de ces greffes sont comparables à ceux obtenus avec des greffes autologues lors d'interventions chirurgicales similaires. Aussi les auteurs concluent que la lyophilisation et la stérilisation par irradiation est actuellement la meilleure méthode pour la préservation des implants osseux.

En 1974, Triantafyllou et Karatzas (335) ont étudié les modifications des propriétés mécaniques du tissu osseux irradié. La lyophilisation ou l'irradiation diminuent la résistance à la traction des fragments osseux. Lorsque les deux traitements sont appliqués, les résultats sont additifs. Aucune décomposition de l'hydroxyapatite n'a été mise en évidence après irradiation, même aux plus fortes doses (10 Mrads). Il est probable que les modifications sont dues à une altération du collagène puisqu'une expérimentation avec de la dure mère a montré que les fibrilles sont modifiées et tendent à former une masse amorphe. Ces altérations sont provoquées surtout par la lyophilisation.

Klen et Pacal (202) ont également examiné les modifications de tissus osseux cortical et médullaire après lyophilisation et irradiation à 2,5 Mrads. Les propriétés mécaniques telles que l'élasticité sont modifiées après traitement. Les examens en microscopie électronique et par diffraction des rayons X ne mettent en évidence aucune modification, ce qui conduit à penser que l'irradiation induit des modifications chimiques et mécaniques des molécules de collagène.

Il ne fait donc pas de doute que la lyophilisation et l'irradiation modifient les propriétés du tissu osseux. Certains auteurs pensent que cela limite l'utilisation d'implants irradiés, cependant d'autres auteurs ont réalisé des greffes avec de tels implants et sont satisfaits des résultats cliniques obtenus.

VI.5.3. - Radiostérilisation de nerfs

Il a été montré que des greffes pouvaient être réalisées lorsqu'un nerf périphérique a été endommagé et que les deux extrémités ne peuvent être suturées. Dans ce cas, le nerf greffé sert simplement de support et permet la régénération périphérique des axones.

Des succès ont été obtenus avec des autogreffes prélevées sur les nerfs périphériques sensoriels, mais une des principales difficultés est que ces nerfs n'ont pas un calibre suffisant (Gibbons, 143). Des homogreffes ont été tentées, mais très souvent des réactions de rejet surviennent et le développement de tissu fibreux aboutit à une greffe non fonctionnelle.

Quelques essais d'implantation d'homogreffes irradiées ont donné des résultats encourageants.

Marmor (cité par Ikeda, 175 et Gibbons, 143) a utilisé des nerfs irradiés à 2 Mrads et conservés à - 25° C pendant 4 à 8 semaines au maximum. Il a constaté que l'irradiation, non seulement stérilise le nerf mais diminue également les réactions inflammatoires après implantation. L'expérimentation réalisée chez des chiens a montré que l'implantation de greffes de nerf sciatique de 3 cm de long permettait une restauration fonctionnelle.

L'auteur a également réalisé des interventions chez l'homme. Dans un cas une homogreffe de 13,5 cm de long a été implantée et 3 mois après les réactions sensorielles étaient restaurées.

Ikeda (175) a réalisé des expérimentations chez le rat et le chien, avec des segments de nerf sciatique irradiés à 2 Mrads par un flux d'électrons. Ces nerfs ont été irradiés à - 25° C et conservés à cette température jusqu'à utilisation.

Parallèlement, à titre de comparaison, une expérimentation chez le rat a été effectuée avec des greffes fraîches, des greffes stérilisés par chauffage à 100° pendant 10 mn ou à 60° pendant 30 mn, ou par l'alcool à 70 % ou le formol à 10 %. Chez le rat, les greffons irradiés avaient un aspect macroscopique et microscopique normal 6 semaines après l'intervention. Par contre, les greffes fraîches montraient un oedème marqué, des réactions hémorragiques et de fortes adhérences. Les examens histologiques ont mis en évidence l'existence de réactions d'infiltration cellulaire massive, de fibrose et de réactions dégénératives. Les nerfs traités par la chaleur, l'alcool ou le formol ont provoqué des réactions de rejet moins marquées que les précédentes.

Sur 12 chiens sur 14 qui ont été suivis pendant plus de 180 jours après l'opération, une régénération des axones a été mise en évidence (conduction à travers la greffe). Trois chiens avaient une réponse motrice périphérique 200 jours après l'implantation. Chez 2 chiens sacrifiés à 203 et 322 jours, la régénération était respectivement de 80 et 67 %.

En raison des bons résultats obtenus, deux interventions ont été réalisées chez l'homme. Dans un cas, une greffe de 13 cm a été implantée sur le nerf péronéal, mais 13 mois après, aucune récupération motrice n'a été obtenue. Dans le 2ème cas, une greffe a été réalisée sur le nerf cubital ; une légère récupération fonctionnelle a été observée 4 mois après.

Campbell et Collaborateurs (63 - 64) ont rapporté leurs résultats avec des nerfs irradiés à 2 Mrads et congelés à -70° C. Des greffes du nerf sciatique de 1 cm ont été implantées chez le chat ; 14 à 19 mois après, les fonctions sensorielles et motrices étaient récupérées ; 17 implantations ont été réalisées chez l'homme, 7 avec succès, 6 avec une récupération partielle ; les 4 autres ont été un échec.

Par la suite, des travaux postérieurs ont montré que pour avoir des résultats favorables, les greffes ne devaient pas dépasser 7 cm de long. La technique opératoire a également été modifiée.

Comtet et Collaborateurs (82) ont réalisé chez le chien deux séries comparatives de greffes nerveuses, l'une avec des greffes stérilisées au merthiolate, l'autre avec des greffes stérilisées par rayonnement gamma à 2 Mrads. Ces greffes de nerfs sciatiques de 5 cm de long ont été implantées au niveau du nerf tibial postérieur chez deux groupes de 16 chiens. Les animaux ont été sacrifiés dans des délais allant de 2 à 12 mois. L'aspect macroscopique (adhérences, atrophies longitudinale et transversale, neurome) a été examiné sous anesthésie générale, puis des études électriques et électromyographiques ont été réalisées sur les corps musculaires dépendants du nerf tibial postérieur. A partir du 5ème mois, la vitesse de conduction nerveuse dans la greffe a été mesurée. Après cette mesure la greffe a été prélevée en vue de l'examen histologique. Macroscopiquement des adhérences étaient souvent présentes et parfois très importantes et à ce point de vue, il n'y avait pas de différences entre greffes conservées avec du merthiolate et greffes irradiées. Les deux types de greffes ont subi un processus d'atrophie

mais qui n'a jamais été total. L'étude de la vitesse de conduction qui implique une réinervation musculaire a donné les résultats suivants : Pour les greffes traitées par le merthiolate, sur six cas, plusieurs fois des chiffres très bas ont été obtenus (10 à 17 m par seconde). Pour les 4 greffes irradiées examinées, la vitesse n'est jamais descendue en dessous de 22 m par seconde et dans un cas, elle était même de 40 m/s. Histologiquement, les greffes ont l'aspect de greffes mortes (absence de dégénérescence et de réaction de rejet). La neurotisation et la myelinisation, en général médiocres, se sont révélées meilleures pour les greffes conservées par le merthiolate sans que cette supériorité ait un retentissement sur le plan clinique et électrique. Les deux types de greffes ont donc donné des résultats similaires, sauf dans le cas de la conductibilité qui était meilleure pour les greffes irradiées.

Les résultats obtenus n'ont pas été considérés par les auteurs, comme suffisamment favorables pour que des essais en clinique humaine soient tentés.

Les quelques essais d'implantation de greffes nerveuses irradiées ont donné des résultats encourageants chez l'animal, mais l'extrapolation à la clinique humaine est difficile car les capacités de régénération nerveuse de l'homme sont moins élevées que celles des animaux de laboratoire.

VI.5.4. - Radiostérilisation de parois vasculaires

Des greffes de parois vasculaires irradiées ont été pratiquées ces vingt dernières années et la radiostérilisation s'est révélée être une des meilleures méthodes de stérilisation pour ce type d'homogreffes. La meilleure technique est l'irradiation de greffons congelés dans de la neige carbonique à - 70° C. En effet, la congélation dans l'azote liquide s'est révélée défavorable (apparition de fissures dans la paroi).

Gross et Collaborateurs (cité par Wright et Trump, 355 et Gibbons 143) ont obtenu d'excellents résultats avec des allogreffes de segments aortiques. Cependant, la mise au point ces dernières années de prothèses en dacron a limité l'emploi de ce type de greffes.

VI.5.5. - Radiostérilisation de dents

Des transplantations dentaires sont possibles à condition de :

- disposer d'un échantillonnage varié de dents pour choisir la dent ayant la forme et les dimensions adéquates,
- posséder une technique sûre et pratique pour stériliser et conserver ces dents.

La stérilisation par la chaleur ne convient pas car elle rend la dent cassante. Les solutions antiseptiques atteignent difficilement les parties internes et n'offrent donc pas toutes les garanties voulues. C'est pourquoi Mathieu et Collaborateurs (230) ont utilisé la stérilisation par rayonnement gamma pour constituer une banque de dents.

Ces dents sont prélevées sur des cadavres, nettoyées, détartrées et débarrassées de leur ligament. L'ablation de la pulpe est ensuite pratiquée par voie apicale. Puis les dents sont immergées dans un tube en polystyrène contenant du soluté physiologique, ce tube est ensuite placé sous double emballage.

Des études bactériologiques de la contamination originelle et après irradiation à différentes doses ont été pratiquées. Les dents supportant parfaitement une dose d'irradiation élevée, une dose de 4,5 Mrads a été choisie pour les dents de la banque, ce qui donne une marge de sécurité importante.

L'implantation de dents, surtout si le ligament alveolo-dentaire a été ôté, a une durée de vie parfois assez courte. Cependant, elle est particulièrement indiquée pour le remplacement de plusieurs dents chez un traumatisé, surtout s'il s'agit d'un enfant ou d'un adolescent. On peut avec une dent de banque obtenir un "garde place" pour gagner du temps avant d'envisager un implant juxta ou endosseux ou une prothèse.

La stérilisation par les rayonnements ionisants paraît particulièrement indiquée pour la mise sur pied de banques de dents.

VI.5.6. - Radiostérilisation de tissus divers

Du fascia lacta placé dans une solution saline, irradié à 2,5 Mrads et conservé à + 4° C a été utilisé en chirurgie plastique (Dexter, 106, Gibbons, 143).

Triantafillou et Karatzes (335) ont montré que la trame collagène du fascia lata était modifiée après irradiation. Cependant Klen et Pascal (202) ont mis en évidence des modifications modérées et pensent que la stérilisation par irradiation est utilisable.

Des implants de dure mère lyophilisée et irradiée à 2 Mreps ont été utilisés pour la réparation de brèches méningées congénitales ou traumatiques (Dexter, 106).

Les essais préliminaires de Klen et Pascal (202) permettent de penser que des greffons dermo-épidermiques ou de membrane chorionique peuvent être radiostérilisés avec 2,5 Mrads.

Enfin Feher et Collaborateurs (126) ont réalisé une expérimentation chez le chien avec des tendons extrasynoviaux lyophilisés et radiostérilisés. Ces tendons ont été implantés sur le tendon d'Achille. 3 à 4 semaines après l'opération le membre a récupéré une activité fonctionnelle qui était devenue parfaite à la 8 - 10ème semaine. Six mois après, l'aspect histologique était semblable à celui du tendon controlatéral. Il a été montré que ces implants n'entraînaient aucune réaction immunologique.

En conclusion, il apparaît que la stérilisation par les rayonnements ionisants est une méthode intéressante pour les tissus biologiques. Cependant, l'irradiation peut modifier les propriétés des tissus. Ces modifications sont parfois favorables, c'est le cas de la diminution de l'antigénicité (220), mais elles peuvent être également néfastes. Little (220) a rappelé qu'un certain nombre de facteurs interviennent sur la qualité finale des tissus biologiques radiostérilisés :

- le temps écoulé d'une part entre décès du donneur et prélèvement de la greffe et d'autre part entre l'irradiation et l'implantation,
- la dose d'irradiation,
- le milieu dans lequel la greffe est irradiée,
- la température d'irradiation et de stockage des greffons.

Pour chaque type de greffes, ces facteurs doivent être pris en considération et une expérimentation doit être faite pour déterminer les conditions optima.

A l'heure actuelle, la stérilisation par rayonnements ionisants est appliquée avec succès aux valves aortiques et aux implants osseux ; de telles greffes radiostérilisées sont utilisées en clinique humaine depuis plusieurs années.

VI.6. - Préparation de vaccins par irradiation

Nous avons vu précédemment que l'effet léthal des rayons ionisants est dû à une inhibition de la multiplication cellulaire. Avec des doses d'irradiation convenables, il est possible de supprimer le pouvoir de multiplication tout en conservant certaines propriétés des bactéries vivantes, comme la mobilité et une partie des échanges respiratoires.

L'inactivation par les rayons ionisants est donc apparue comme un procédé pouvant permettre la préparation de vaccins présentant un pouvoir immunogène proche de celui des microorganismes vivants. Un certain nombre de travaux ont donc été effectués sur ce sujet.

VI.6.1. - Vaccins bactériens

En 1958, Troitsky et Collaborateurs (336), Tumanyan (337), ont étudié les effets des radiations ionisantes sur les propriétés antigéniques et immunologiques de Shigella flexner et Salmonella typhi Ty2. Des suspensions bactériennes contenant 28 à 70 10^9 germes par ml ont été irradiées avec une dose de 1,5 à 2 Mrads qui s'est montrée suffisante pour obtenir une inactivation totale.

La toxicité de ces radiovaccins s'est révélée plus faible que celles d'autres vaccins inactivés par la chaleur ou le formol.

Des groupes de 5 lapins ont été immunisés avec les différents vaccins par trois injections à 7 jours d'intervalle et les agglutinines ont été titrées. Le pouvoir immunisant et protecteur des vaccins irradiés a été trouvé comparable à celui des vaccins formolés.

Tumanyan (339) a par la suite poursuivit ses travaux sur la diminution de la toxicité des vaccins anti-typhoïdiques irradiés. Des doses supérieures à 2 Mrads entraînent une diminution significative de la toxicité des différents antigènes bactériens extraits. Une dose de 2,5 à 5 Mrads entraîne une diminution de toxicité de 2 à 5 fois pour les antigènes Vi et 2 à 4 fois pour les antigènes lipopolysaccharidiques, lorsque l'injection est faite par voie sous-cutanée, intraveineuse ou intrapéritonéale.

Bonet-Maury et Collaborateurs (42) ont préparé des vaccins inactivés par rayonnement ionisant. Pour Salmonella typhi, le vaccin provoque

une montée d'anticorps O, H et Vi comparable à celle obtenue avec des bactéries vivantes. Un radiovaccin de Vibrio cholerae a un pouvoir protecteur chez la souris, comparable au vaccin chauffé.

Nous mêmes (332) avons comparé le pouvoir immunogène de vaccins staphylococciques inactivés par irradiation et par le formol. Deux souches de Staphylococcus aureus ont été utilisées pour la préparation de ces vaccins : S. aureus Wood 46 (souche riche en polysaccharide A) et S. aureus 17 A qui est riche en agglutinogène h₁ (méthode de Oeding).

Des suspensions en eau physiologique ont été préparées de façon à obtenir une teneur d'environ $1 \cdot 10^9$ bactéries par ml. La D10 des souches a été déterminée de façon à calculer la dose d'irradiation juste nécessaire pour obtenir une inactivation totale. Cette dose est de 150 Krads pour la souche 17 A et 175 Krads pour la souche Wood 46. Des contrôles ont confirmé la stérilité. Parallèlement, une fraction des suspensions a été traitée par le formol à 1 % pour la préparation de l'autre type de vaccin.

Les 4 vaccins ont été inoculés par voie intraveineuse à 4 lots de 5 lapins selon la technique d'Oeding. Après la 3ème série d'immunisation les taux d'agglutinines obtenus étaient supérieurs pour le vaccin 17 A irradié (1/400 à 1/800 pour le vaccin irradié et 1/100 à 1/400 pour le vaccin formolé). Par contre, aucun anticorps antipolysaccharide A n'est apparu après immunisation par le vaccin Wood 46 irradié alors qu'avec le vaccin formolé, tous les lapins se sont immunisés. Il semble donc que l'irradiation ait modifié le pouvoir immunogène du polysaccharide A.

Negretti (241) a réalisé une étude comparative de l'activité immunisante de vaccins inactivés par irradiation et par la chaleur. Des suspensions de E. coli, Proteus vulgaris, Staphylococcus aureus, Streptococcus ovalis contenant environ $15 \cdot 10^9$ bactéries/ml ont été inactivées, soit par chauffage à 85° C pendant une heure, soit par irradiation à 1 - 1,5 - 2 - 2,5 Mrads.

Le pouvoir immunogène chez le lapin a été testé après 10 administrations per os. Dix jours après la fin du traitement, les animaux ont été saignés et le titre des agglutinines spécifiques a été déterminé. Pour E. coli, les radiovaccins ont donné des titres plus élevés que le vaccin chauffé. Le titre le plus élevé a été obtenu avec le vaccin irradié à 2,5 Mrads.

Pour P. vulgaris, les résultats sont variables, mais sont souvent plus favorables pour les vaccins radiostérilisés. Là encore le meilleur titre est obtenu avec le vaccin traité par 2,5 Mrads.

Pour S. aureus et S. ovalis, les résultats sont meilleurs avec les vaccins irradiés à 1 Mrad.

Un test de protection chez la souris a été également pratiqué. Les souris ont été immunisées par administration per os des 4 vaccins mélangés (10 administrations de 0,8 ml chaque jour avec interruption de 2 jours après la 5ème prise). 10 jours après la fin de la vaccination, une injection d'épreuve a été pratiquée (injection intrapéritonéale de $1 \cdot 10^9$ germes pour E. coli, $1,2 \cdot 10^9$ pour P. vulgaris, $7 \cdot 10^9$ pour S. aureus, et $20 \cdot 10^9$ pour S. ovalis).

La létalité a été mesurée au 7ème jour.

Dans tous les cas, le pouvoir protecteur était légèrement plus important pour les vaccins radiostérilisés que pour les vaccins chauffés. L'efficacité était maximum pour les vaccins d'E. coli et de P. vulgaris irradiés à 1 et 2,5 Mrads. Pour S. aureus et S. ovalis, ce sont les vaccins irradiés à 1 Mrad qui ont donné les meilleurs résultats.

Les quelques travaux effectués avec des vaccins bactériens inactivés par les rayonnements ionisants n'ont pas montré que le pouvoir immunogène était fortement augmenté, mais il est souvent légèrement supérieur à celui des vaccins classiques. D'autre part, le fait que l'irradiation diminue la toxicité de certains antigènes est un point intéressant.

VI.6.2. - Vaccins viraux

Quelques essais d'utilisation de l'irradiation par rayonnement ionisant pour la préparation de vaccins viraux ont été effectués.

En 1951, Dick et Coll. (108) ont immunisé des rats avec du poliovirus inactivé par irradiation. Une infection des rats par du virus vivant a été ensuite pratiquée pour évaluer le pouvoir protecteur.

Des expériences comparatives ont été réalisées avec des vaccins inactivés par rayonnement ultra-violet et par le formol. Le pouvoir protecteur des vaccins inactivés par un flux d'électron a été trouvé comparable à celui des deux autres types de vaccins.

Kaplan (191) a testé le pouvoir protecteur du virus de la vaccine inactivé par irradiation γ . Le vaccin, obtenu après irradiation à 0,6 ou 0,8 Mrad, était capable de protéger l'animal contre l'inoculation de virus vivant. Par contre lorsque la dose d'irradiation est supérieure à 1 Mrad, le virus de la vaccine perd ses propriétés immunogènes.

Reitman et Tonik (279) ont travaillé sur un vaccin de virus de l'encéphalite équine du Venezuela (virus VEE) inactivé par une dose de 8 Mrads de rayonnement gamma. Ce vaccin administré par voie intrapéritonéale chez des cobayes s'est montré efficace ; il protège les animaux contre l'inoculation de virus VEE infectieux par voie intrapéritonéale ou aérienne. Les études sérologiques ont montré que l'antigénicité du vaccin irradié était excellente puisque la majorité des animaux possédait de hauts titres d'anticorps neutralisants et inhibants l'hémagglutination.

Gruber a également testé le pouvoir immunogène de vaccins de virus VEE inactivés par irradiation. Une dose de 6 Mrads est capable d'inactiver totalement des suspensions titrant 9 PFU/ml sans perte notable, in vitro, de l'antigénicité. Les vaccins administrés à des souris leur confèrent une excellente protection contre l'inoculation de 100 000 DL 50 de virus infectieux.

Ces résultats sont particulièrement intéressants car il s'est avéré que le traitement par le formol ne convenait pas pour la préparation de vaccin de virus VEE.

Les travaux sur la préparation de vaccins viraux par irradiation sont peu nombreux. Dans certains cas, cette méthode d'inactivation donne de meilleurs résultats que les procédés classiques.

TRAVAIL PERSONNEL

I N T R O D U C T I O N

La plupart des travaux sur la sensibilité des microorganismes aux rayons ionisants ont été effectués soit avec des souches de collection, soit avec des souches isolées de denrées alimentaires ou de prélèvements d'air et de poussières.

Le but de notre travail personnel a été d'étudier la sensibilité au rayonnement gamma de souches isolées en milieu hospitalier, ceci en vue de l'application de la radiostérilisation au matériel médico-chirurgical à usage multiple et aux tissus biologiques.

Nous avons donc déterminé les courbes doses-survivants de 131 souches "hospitalières", appartenant à 11 espèces microbiennes et de sept souches de collection. Les D10 ont ensuite été calculées à partir de ces courbes.

Ce travail a été mené avec deux objectifs principaux :

- comparer les radiosensibilités de souches isolées en clinique humaine à celles de souches étudiées jusqu'alors,
- voir s'il existe des différences importantes de radiosensibilité entre les souches d'une même espèce.

Les caractères biochimiques et sérologiques, la résistance aux antibiotiques de ces souches ont été étudiés afin de mettre, éventuellement, en évidence une relation entre le niveau de radiorésistance et un profil biochimique, sérologique et d'antibiorésistance particulier.

A - MATERIEL ET METHODES

I - SOUCHES TESTEES

Les souches étudiées se répartissent comme suit :

- 8 souches de collection :

Staphylococcus aureus Oxford IPP 53 154

Pseudomonas aeruginosa 414 Lausanne

Streptococcus faecium IPP 5431

Streptococcus faecium A₂¹

Acinetobacter lwoffii IPP 5382

Acinetobacter calcoaceticus IPP 5290

Candida albicans IPP 646

Bacillus pumilus E 601

- 131 souches sauvages dont :

34 *Staphylococcus aureus*

14 *Staphylococcus epidermidis*

10 *Streptococcus faecalis*

2 *Streptococcus durans*

15 *Streptococcus faecium*

22 *Escherichia coli*

13 *Pseudomonas aeruginosa*

2 *Acinetobacter lwoffii*

4 *Acinetobacter calcoaceticus*

11 *Candida albicans*

2 *Candida tropicalis*

2 *Candida krusei*

Le choix de ces souches peut paraître un peu disparate. En fait, il nous a paru intéressant d'étudier la radiosensibilité d'une part de souches responsables de contaminations intrahospitalières telles que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et en particulier *E. coli* entéro-pathogènes, *Pseudomonas aeruginosa* et d'autre part de souches connues pour avoir une radiorésistance élevée telles que les *Streptococcus faecium* et les autres *Streptococcus* du groupe D, *Acinetobacter* et les levures du genre *Candida*.

Enfin, nous avons étudié la radiosensibilité de Staphylococcus epidermidis car c'est un contaminant fréquent du matériel médico-chirurgical, or il a été assez peu étudié jusqu'alors.

I.1. Origine des souches

Ces souches ont été choisies par tirage au sort dans une collection de plusieurs centaines de souches recueillies dans quatre laboratoires de bactériologie des hôpitaux lyonnais. La plupart d'entre elles provenaient des hôpitaux Neurologique et Cardiologique et de services de pédiatrie. Ces souches ont été isolées de prélèvements divers : pus, crachats, prélèvements de gorge, urines, hémocultures, coprocultures, etc... Elles ont été conservées soit par lyophilisation, soit par congélation à -20° dans un bouillon coeur-cerveille.

I.2. - Caractères des différentes souches

I.2.1. - Staphylococcus aureus

Les 34 souches sauvages étudiées ont été identifiées selon les critères classiques. Toutes les souches choisies étaient pigmentées et possédaient une coagulase. La présence d'antigène de groupe (polysaccharide A et protéine A) et de type a été recherchée. La résistance aux antibiotiques a été déterminée.

I.2.1.1. - Recherche de protéine A et polysaccharide A

Elle a été faite selon la méthode d'immunodiffusion en gel mise au point par Oeding (242b). 7 puits sont creusés, à l'aide d'un emporte pièce, dans une boîte de Pétri contenant un gel d'Agar noble. Le puits central est rempli avec un immun sérum (sérum anti Wood 46 pour la recherche du polysaccharide A ; sérum anti Cowan I pour la recherche de la protéine A). Ces sérums ont été obtenus par immunisation de lapins avec une suspension formolée de S. aureus Wood 46 ou Cowan I.

Deux puits du système sont remplis avec une suspension épaisse des souches de référence (Wood 46 ou Cowan I). Les 4 autres puits sont remplis avec des suspensions des souches à tester.

Lorsque la souche possède l'antigène recherché une ligne de précipitation apparaît en 24 h entre le puits antigène et le puits sérum.

Lorsque le premier résultat était négatif, cette recherche a été pratiquée une seconde fois.

7 souches étaient dépourvues de polysaccharide A ; pour sept autres, la présence de protéine A n'a pu être mise en évidence (voir tableau II, pages 259 à 262).

I.2.1.2. Sérotypie

Elle a été effectuée selon la technique du Docteur Pillet (252 bis) avec les sérums spécifiques I, II, III, 11, 14-18. Deux souches seulement ont été trouvées non sérotypables (voir tableau II).

I.2.1.3. - Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

Elle a été pratiquée par une méthode de diffusion en gélose avec les sensi disques Mérieux. Les antibiotiques testés ont été les suivants :

Betalactamines	Pénicilline	P (Abréviations)
	Méthicilline	DP
	Oxacilline	OX
	Ampicilline	A
	Céphalothine	CF
	Céphaloridine	CD
Aminosides	Streptomycine	S
	Kanamycine	K
	Néomycine	N
	Gentamicine	GM
Tétracycline		T
Chloramphénicol		C
Macrolides	Erythromycine	E
	Lincomycine	L
Synergistines	Pristinamycine	PR
Novobiocine		NB
Rifampicine		RA
Acide fusidique		FA

La lecture des zones d'inhibition a été faite après 24 heures d'incubation à 37° C et la souche a été considérée comme résistante lorsque le diamètre est inférieur à 15 mm.

Les résultats figurent dans le tableau IL.

I.2.2. Staphylococcus epidermidis

Après identification, une étude biochimique détaillée a été entreprise pour classer les souches en biotypes selon la méthode de Baird-Parker (30bis). La production de fibrinolysine, de lipase, gélatinase, toxine β et la présence de polysaccharide A et de protéine A ont également été recherchées.

Enfin la sensibilité aux antibiotiques a été déterminée.

I.2.2.1. - Identification

Elle a été réalisée selon les méthodes classiques.

Toutes les souches utilisaient le glucose en aérobiose et anaérobiose, il s'agissait donc bien de *Staphylococcus epidermidis* et non pas de *Micrococcus*.

I.2.2.2. - Biotypie (voir tableau L)

Nous avons utilisé les critères de biotypie décrits par Baird-Parker :

- utilisation du mannitol en aérobiose et anaérobiose par la méthode de Hugh et Leifson,

- utilisation du maltose en aérobiose, selon la technique de Hugh et Leifson

- utilisation du lactose sur gélose lactosée au BCP

- production d'acétoïne sur milieu de Clarks et Lubs après 4 jours d'incubation à 37°

- production de phosphatase par la méthode de Barbet et Kuper avec comme substrat la phénolphthaleïne phosphate à 1 %.

Les résultats figurent dans le tableau L, pages 264 à 267.

CARACTERES DES SOUCHES DE

N° DE LA SOUCHE	PRELEVEMENT D'OU LA SOUCHE EST ISSUE	SEROTYPE
71/02/17	urine	I
71/02/19	gorge	I
71/02/21	pus	I
71/02/27	pustule	I
71/02/32	plaie	I
71/02/82	liquide pleural	I
71/02/20	gorge	II
71/02/51	urine	II
71/02/26	gorge	I - II
71/02/52	gorge	I - II
71/02/53	pus	I - II
71/02/56	gorge	I - II
71/02/57	gorge	I - II
71/02/62	pus	I - II
71/02/84	liquide pleural	I - II
71/02/22	gorge	III
71/02/29	gorge	III
71/02/61	crachat	III
71/02/63	pus	III

CARACTERES DES SOUCHES DE

N° DE LA SOUCHE	PRELEVEMENT D'OU LA SOUCHE EST ISSUE	SEROTYPE
71/02/24	pus	18
71/02/28	pus	18
71/02/30	crachat	18
71/02/54	canule	18
71/02/59	gorge	18
71/02/23	urine	14 - 18
71/02/25	pus	14 - 18
71/02/31	pus	14 - 18
71/02/49	tracheotomie	III - 14 - 18
71/02/55	gorge	11
71/02/58	pus	11
71/02/60	liquide pleural	11
71/02/83	urine	11
71/02/50	oeil	o
71/02/64	liquide pleural	o

STAPHYLOCOCCUS AUREUS

POLYSACCHARIDE A	PROTEINE A	RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES
-	+	P - DP - OX - T - S - K - E - L
+	+	P - DP - OX - A - T - S - E - C
+	+	P - DP - OX - A - T - S - E - C
+	+	P - DP - OX - A - T - S - E - C
+	-	P - DP - A - T - S - E
+	+	P - DP - OX - A - T - S - E - C
+	+	P - DP - A - T - S - E - C
+	+	P - DP - OX - A - T - S - E - C
+	-	P - DP - OX - A - T - S - E - L
+	-	
+	-	P - A
+	-	T
+	-	P
+	+	S
+	+	P - DP - A - T

I.2.2.3.- Production d'enzymes

- Fibrinolysine *****

La production de fibrinolysine a été recherchée sur gélose trypticase soja dans laquelle a été incorporé 12 % de plasma humain ci-traté. La présence d'un halo clair autour de la souche après 24 à 48 heures d'incubation indique une réaction positive.

- Lipase *****

Elle a été mise en évidence sur gélose trypticase soja au tween 80 (1 %) et au CaCl_2 (0,01 %). Après 24 à 48 heures d'incubation à 37°, l'activité lipasique se manifeste par une zone de précipitation opaque autour de la pastille d'ensemencement.

- Gélatinase *****

La production de gélatinase a été recherchée par la méthode de Frazier

- Toxine β *****

Les souches ont été ensemencées sur gélose à 5 % de sang de mouton. La lecture est pratiquée après 48 heures d'incubation à 37°.

I.2.2.4.- Sérotypie

Elle a été effectuée selon la méthode de Pillet (252^{ter}) avec les sérums spécifiques 186 et 260.

I.2.2.5.- Recherche de polysaccharide A et protéine A

La technique utilisée est celle qui a été décrite précédemment pour *Staphylococcus aureus*.

I.2.2.6. - Sensibilité aux antibiotiques

Nous avons déterminé les concentrations minima inhibitrices (CMI) en milieu gélosé avec une technique utilisant un repiqueur à sites multiples inspiré du replicateur de Steers, permettant de repiquer 32 souches à la fois.

ORIGINE ET CARACTERES BIOCHIMIQUES

N° DE LA SOUCHE	PRELEVEMENT D'OU LA SOUCHE EST ISSUE	BIOTYPE	FIBRINOLYSINE
71/02/85	pus	4	-
71/02/86	valve aortique	1	+
71/02/88	pus	4	-
71/02/89	cutané	1	-
71/02/90	aspiration gas- trique	1	+
71/02/91	urine	2	+
71/02/92	gorge	1	-
71/02/93	oeil	3	-
71/02/94	urine	1	+
71/02/95	pus	4	-
71/02/96	plaie	1	+
71/02/116	pus	3	-
71/03/94	plaie	2	-
71/03/95	gorge	4	-

DES SOUCHES DE STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS

LIPASE	GELATINASE	TOXINE β	POLY. A	PROTEINE A	SEROTYPE
-	-	+	+	-	o
+	+	-	-	-	o
+faible	-	-	+	-	260
+ faible	+ faible	-	-	-	o
+	+	+ faible	-	-	186
-	+	-	-	-	autoaggl.
-	+	-	-	-	186
-	-	+	+	-	o
++	+	-	-	-	260
-	+	-	-	-	186
+	+	-	-	-	o
-	-	-	-	-	o
+	-	-	-	-	o
+	-	-	-	-	260

Tableau LI

CONCENTRATIONS MINIMA INHIBITRICES *

SOUCHES	PENICILLINE	AMPICILLINE	OXACILLINE	CEPHALOTHINE	CEPHALORIDINE
71/02/85	0,2	0,4	0,4	0,1	0,05
71/02/86	0,8	1,6	0,4	≤ 0,025	0,8
71/02/88	1,6	3,12	0,2	0,05	0,1
71/02/89					
71/02/90					
71/02/91	0,025	0,025	0,05	0,1	0,025
71/02/92					
71/02/93	0,1	0,2	0,1	0,1	≤ 0,025
71/02/94					
71/02/95	0,2	0,05	≤ 0,025	0,1	0,025
71/02/96	0,025	0,025	≤ 0,025	0,1	≤ 0,025
71/02/116	3,12	50	100	50	3,12
71/03/94					
71/03/95					

* En. µg/ml

DES STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS

TETRACYCLINE	CHLORAM-PHENICOL	ERYTHROMYCINE	GENTAMICINE	PRISTINA-MYCINE	RIFAMPICINE
25	50	12,5	0,05	0,1	$\leq 0,025$
25	50	100	0,05	1,6	$\leq 0,025$
50	1,6	$\leq 0,025$	0,025	0,025	$\leq 0,025$
50	3,12	0,2	0,025	0,05	$\leq 0,025$
50	100	> 100	0,8	0,1	$\leq 0,025$
25	1,6	0,8	0,1	0,05	$\leq 0,025$
0,4	3,12	$\leq 0,025$	0,05	0,05	$\leq 0,025$
0,4	1,6	> 100	0,05	0,2	$\leq 0,025$

11 antibiotiques ont été testés :

Pénicilline G
Ampicilline
Oxacilline
Céphalothine
Céphaloridine
Tétracycline
Chloramphénicol
Erythromycine
Pristinamycine
Gentamicine
Rifampicine

Parallèlement, la souche témoin de Staphylococcus aureus 209P a été également testée de façon à vérifier la reproductibilité des résultats.

Les résultats obtenus figurent dans le tableau LI, pages 266 et 267.

I.2.3. - Streptococcus faecalis - faecium - durans

I.2.3.1. - Identifications biochimiques

Elles ont été réalisées selon les critères biochimiques classiques :

- pousse sur milieu à l'azoture de Na de Hajna-Perry
- dégradation de l'esculine
- pousse sur milieu au tellurite de K (1/2500e)
- pousse sur milieu à 6,5 % de NaCl
- pousse sur milieu à pH 9,6
- fermentation du mannitol sur eau peptonée additionnée de 1 % de mannitol et de bleu de bromothynol
- fermentation de l'arabinose sur milieu similaire contenant 1 % d'arabinose
- fermentation du lactose sur gélose lactosée au bleu de bromocresol pourpre.

Pour S. faecalis ont été également recherchées :

- la production d'hémolysine sur gélose à 5 % de sang de cheval
- la production de gélatinase par la méthode de Frazier.

Tableau LII

ORIGINE - CARACTERES ET CMI * DES

	SOUCHES N°	VARIETE	PRELEVEMENT	PENI.	AMPI.	OXA.
Streptococcus faecalis	71/02/117	liquefasciens	urine	1,6	3,12	12,5
	71/02/118		urine	1,6	0,8	25
	71/02/119		urine	3,12	3,12	25
	71/02/121		coproculture	3,12	0,8	25
	71/02/122		LCR	3,12	0,8	25
	71/02/123	hemolyticus	gorge	6,25	6,25	>100
	71/02/124		ombilical	3,12	3,12	50
	71/02/128		pus	3,12	0,8	12,5
	71/03/31		coproculture	0,8	0,2	3,12
	71/06/89		urine	1,6	3,12	25
Streptococcus durans	71/04/104		hemoculture	1,6	0,2	12,5
	71/04/112		hemoculture	0,1	0,1	0,2

* = en mcg/ml

SOUCHES DE STREPTOCOCCUS FAECALIS ET DURANS

CEPHA T.	CEPHA D.	TETRA.	CHLOR.	ERYTH.	GENTA	PRISTI.	RUFAM.
50	25	100	12,5	0,4	3,12	6,25	6,25
50	12,5	100	12,5	0,2	6,25	6,25	3,12
50	25	100	12,5	0,2	3,12	6,25	6,25
50	25	> 100	12,5	> 100	3,12	25	25
50	25	6,25	12,5	0,4	12,5	6,25	12,5
100	12,5	0,8	6,25	1,6	12,5	1,6	25
50	25	100	25	> 100	3,12	6,25	6,25
50	12,5	100	100	> 100	6,25	25	3,12
12,5	1,6	1,6	12,5	0,4	12,5	0,8	0,4
50	25	50	12,5	0,8	6,25	6,25	6,25
25	3,12	3,12	12,5	0,025	12,5	0,025	0,025
0,1	0,025	100	3,12	0,025	6,25	0,2	0,1

ORIGINE - CARACTERES ET CMI * DES

SOUCHES N°	PRELEVEMENTS	PENI.	AMPI.	OXA.	CEPHAT.
71/06/88	coproculture	25	12,5	>100	>100
71/06/90	coproculture	1,6	0,4	50	50
71/06/92	vaginal	3,12	0,4	12,5	100
71/06/93	pus	0,8	3,12	3,12	25
71/06/94	coproculture	6,25	3,12	50	100
71/06/95	rhinopharyngé	3,12	6,25	25	100
71/06/96	urine	100	100	>100	>100
71/06/97	coproculture	3,12	3,12	50	100
71/06/98	vaginal	6,25	1,6	50	>100
71/06/99	urine	100	100	>100	>100
71/06/100	NP	0,1	0,1	0,8	3,12
71/06/101	vaginal	6,25	3,12	100	100
71/06/102	urine	100	100	>100	>100
71/06/103	valve aortique	25	12,5	>100	>100
71/07/104	ombilic	0,1	0,2	0,8	3,12
71/07/94	Collection IPP n°5431				
St.faecium A ₂₁	Collection Dr Christensen				

NP = non précisé

* en mcg/ml

SOUCHES DE STREPTOCOCCUS FAECIUM.

CEPHAD.	TETRA.	CHLOR.	ERYTHR.	GENTA.	PRISTI.	RIFAM.
25	100	6,25	> 100	6,25	3,12	0,025
0,4	50	100	0,025	6,25	0,8	3,12
6,25	1,6	12,5	0,4	12,5	3,12	50
1,6	1,6	6,25	0,2	25	0,8	0,025
6,25	1,6	6,25	1,6	12,5	0,4	50
6,25	0,8	6,25	0,4	25	0,2	25
100	100	6,25	> 100	12,5	1,6	12,5
6,25	12,5	6,25	0,8	12,5	0,4	12,5
12,5	1,6	12,5	1,6	12,5	0,2	25
100	100	6,25	> 100	12,5	1,6	6,25
0,2	1,6	6,25	1,6	12,5	3,12	50
6,25	0,8	6,25	0,4	12,5	0,4	50
100	100	6,25	0,4	12,5	0,8	25
25	100	12,5	> 100	6,25	1,6	0,025
0,2	0,8	6,25	0,4	12,5	0,4	< 0,006

I.2.3.2. - Sensibilité aux antibiotiques

Les concentrations minima bactéricides ont été déterminées selon la technique décrite précédemment pour les staphylocoques et avec les mêmes antibiotiques.

Les résultats figurent dans les tableaux LII et LIII, pages 269 à 272.

I.2.4. Escherichia coli

22 souches ont été étudiées dont 13 souches d'E. coli enteropathogenes toutes isolées de coprocultures.

I.2.4.1. - Identification et sérotypie

Ces souches ont été identifiées par les méthodes biochimiques classiques. La sérotypie a été effectuée à l'aide des sérums produits par l'Institut Pasteur.

Les souches d'E. coli enteropathogenes appartiennent à 7 sérotypes différents (voir tableau LV, pages 276-277).

I.2.4.2. - Sensibilité aux antibiotiques

Elle a été étudiée par la méthode de détermination des CMI en milieu gélosé décrite précédemment. Les huit antibiotiques testés furent les suivants : Ampicilline, Céphalotine, Chloramphénicol, Gentamicine, Colistine, Tétracycline, Acide nalidixique, Rifampicine. Les gammes de concentrations allaient de 100 mcg à 0,2 mcg.

En même temps, les CMI de ces antibiotiques vis à vis de la souche test d'E. coli Monod ont été déterminées afin de s'assurer de la validité des résultats obtenus.

Les résultats figurent dans les tableaux LIV et LV, pages 274 à 277.

I.2.5. Pseudomonas aeruginosa

13 souches hospitalières et la souche de collection 414 Lausanne* ont été utilisées pour notre étude.

I.2.5.1. - Identification et sérotypie

L'identification a été basée sur les caractères biochimiques classiques.

* Cette souche provient du laboratoire du Pr Bonet-Maury †
Institut du Radium - Paris

Tableau LIV

ESCHERICHIA COLI NON ENTEROPATHOGENES:

SOUCHES N°	PRELEVEMENT	AMPI.	CEPHAT.
71/04/03	urine	3,12	12,5
71/04/04	vagin	3,12	6,25
71/04/09	urine	6,25	6,25
71/04/12	pus	>100	3,12
71/04/34	pus	6,25	6,25
71/04/35	hémoculture	>100	6,25
71/04/38	urine	6,25	12,5
71/04/40	urine	12,5	6,25
71/03/128	pus	50	50

* Les CMI sont exprimées en mcg/ml

ORIGINE ET CMI *

CHLORAM.	GENTA.	COLI.	TETRA.	NEGRAM.	RIFAM.
12,5	1,6	50	1,6	25	6,25
6,25	0,8	0,2	100	6,25	6,25
12,5	1,6	25	100	25	12,5
6,25	0,4	0,2	100	6,25	6,25
6,25	0,8	0,4	1,6	3,12	12,5
> 100	0,4	0,2	50	3,12	6,25
6,25	0,8	0,2	0,8	6,25	12,5
6,25	0,4	0,2	1,6	1,6	6,25
> 100	0,4	0,2	50	1,6	12,5

Tableau LV

SEROTYPE ET CMI DES SOUCHES

SOUCHES N°	SEROTYPE	AMPI.	CEPHAT.
71/04/45	0127 B8 0128 B12	12,5	12,5
71/04/46	026 B6	12,5	6,25
71/04/47	0128 B12	12,5	3,12
71/04/48	0128 B12	3,12	6,25
71/04/65	0119 B14	6,25	3,12
71/04/66	055 B5	3,12	12,5
71/04/69	0111 B4	> 100	> 100
71/04/71	026 B6	12,5	6,25
71/04/73	0125 B15	25	3,12
71/04/75	0125 B15	25	6,25
71/04/79	086 B7 0127 B8	12,5	6,25
71/05/06	0111 B4	> 100	> 100
71/05/08	0126 B16	12,5	6,25

D'ESCHERICHIA COLI ENTEROPATHOGENES

CHLORAM.	GENTA.	COLI.	TETRA.	ACIDE NALIDIXIQUE	RIFAM.
12,5	0,4	0,2	3,12	1,6	25
6,25	≤ 0,2	0,2	3,12	3,12	6,25
12,5	≤ 0,2	0,4	3,12	3,12	12,5
6,25	0,8	0,2	1,6	6,25	6,25
3,12	0,8	0,2	1,6	1,6	3,12
6,25	1,6	0,1	1,6	6,25	6,25
6,25	0,4	1,6	3,12	100	12,5
6,25	0,4	0,2	3,12	3,12	6,25
3,12	0,4	0,2	1,6	3,12	25
6,25	0,8	0,2	3,12	3,12	12,5
6,25	0,4	0,2	1,6	3,12	12,5
6,25	0,8	0,2	100	>100	6,25
6,25	0,4	0,2	50	1,6	12,5

La sérotypie a été effectuée selon la classification de Habs à l'aide des sérums de l'Institut Pasteur.

Les résultats figurent dans le tableau LVI (pages 279 et 280).

I.2.5.2. - Sensibilité aux antibiotiques

Les concentrations minima inhibitrices (CMI) ont été déterminées par la technique décrite précédemment pour les E. coli, avec les mêmes antibiotiques, plus la Carbénicilline.

Les résultats sont portés dans le tableau LVI (pages 279, 280).

I.2.6. Acinetobacter

Notre étude a porté sur un petit nombre de souches : 6 souches hospitalières et 2 souches de collection.

I.2.6.1. - Identification

Elle repose sur les critères morphologiques et biochimiques classiques.

I.2.6.2. - Sensibilité aux antibiotiques

Les CMI ont été déterminées par la technique déjà décrite (les résultats figurent dans le tableau LVII, pages 281 et 282).

I.2.7. - Levures

16 souches de levures ont été étudiées (voir tableau LVIII, page 283). Leur identification a été réalisée selon les critères habituels.

I.2.8. - Bacillus

Nous avons par ailleurs étudié la radiosensibilité d'une souche test recommandée par le "Code of practice" :

- Bacillus E 601 *

* Cette souche provient du laboratoire du Dr Christensen.

Tableau LVI

ORIGINE, SEROTYPE ET CMI * DES

SOUCHES N°	PRELEVEMENT	SEROTYPES	AMPI.	CEPHAT.
71/03/33	drain pleural	10	> 100	> 100
71/03/37	urine	11	> 100	> 100
71/03/39	urine	2	> 100	> 100
71/03/42	trachée	6 - 13	> 100	> 100
71/03/43	pus	11	> 100	> 100
71/03/48	coproculture	3	> 100	> 100
71/03/82	eau de couveuse	8	> 100	> 100
71/03/85	plaie	non sérotypable	> 100	> 100
71/03/88	coproculture	6	> 100	> 100
71/03/91	coproculture	8	> 100	> 100
71/03/114	pus	non sérotypable	> 100	> 100
71/03/123	pus	1	> 100	> 100
71/03/124	urine	8	> 100	> 100

* CMI en mcg/ml

SOUCHES DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

CARBENT.	CHLORAM.	GENTA.	COLI.	TETRA.	ACIDE NALIDIXIQUE	RIFAM.
25	100	0,8	0,8	25	100	25
50	>100	3,12	0,8	50	>100	25
25	>100	0,8	0,8	25	>100	25
25	100	0,4	0,4	12,5	50	25
50	>100	1,6	0,8	100	>100	25
50	>100	1,6	1,6	50	100	50
100	>100	0,8	0,8	25	>100	25
12,5	100	0,8	0,8	25	100	25
25	>100	0,8	0,8	50	100	25
25	>100	0,8	0,8	50	100	50
50	>100	1,6	0,8	50	>100	50
50	>100	1,6	0,8	25	>100	25
>100	>100	1,6	1,6	25	>100	25

Tableau LVII

ORIGINE, CMI * DES

ESPECE	SOUCHE N°	PRELEVEMENT	AMPI.
Acinetobacter lwoffii	71/07/34	urine	3,12
	71/07/84	drain	0,4
Acinetobacter calcoaceticus	71/07/35	urine	100
	71/07/37	urine	1,6
	71/07/38	plaie	100
	71/07/82	tracheotomie	50

* CMI en mcg /ml

SOUCHES D'ACINETOBACTER

CEPHAT.	CHLORAM.	GENTA.	COLI.	TETRA.	ACIDE NALIDIXIQUE	RIFAM.
50	12,5	0,8	6,25	1,6	6,25	6,25
12,5	3,12	0,2	0,4	0,8	6,25	1,6
≥ 100	≥ 100	0,8	0,4	1,6	12,5	1,6
50	3,12	0,2	0,1	0,8	6,25	1,6
≥ 100	≥ 100	1,6	0,4	100	25	6,25
≥ 100	100	1,6	0,8	1,6	12,5	6,25

Tableau LVIII

ORIGINE DES SOUCHES DE LEVURES

ESPECES	SOUCHES N°	PRELEVEMENT
Candida albicans	1	crachat
	5	crachat
	14	gorge
	49	rhino-pharyngé
	80	gorge
	82	gorge
	107	crachat
	142	bouche
	158	gorge
Candida tropicalis	165	crachat
	172	coproculture
Candida krusei	25	crachat
	35	coproculture
Candida krusei	117	coproculture
	148	coproculture

II - DETERMINATION DE LA RADIOSENSIBILITE

Nous avons déterminé pour chaque souche microbienne, la D10 qui, nous le rappelons, est la dose qui diminue d'un facteur 10, le nombre de cellules viables d'une population microbienne. Pour cela, il était donc nécessaire de tracer les courbes d'inactivation en irradiant à différentes doses les échantillons microbiens et en numérant les germes survivants à chaque dose d'irradiation.

II.1 - Préparation des échantillons microbiens

Dans la presque totalité des cas, la radiosensibilité a été déterminée en milieu liquide, cependant quelques travaux ont été réalisés sur des échantillons desséchés.

II.1.1. - Préparation des suspensions

Nous avons choisi d'effectuer notre étude sur des suspensions en eau distillée, afin d'éliminer totalement l'influence des facteurs protecteurs présents dans certains milieux et qui risquaient de gêner l'étude comparative des résultats. La radiosensibilité des microorganismes étant fonction de l'âge de la culture, nous avons fait notre expérimentation sur des germes en phase stationnaire, car cela correspond à la radiorésistance maxima. Enfin, nos suspensions ont été préparées et agitées en présence d'air, elles contenaient donc de l'oxygène dissous.

II.1.1.1. - Préparation des suspensions de Staphylococcus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, et Acinetobacter.

Avant chaque essai, toutes les souches sont repiquées au moins deux fois sur des boîtes de gélose ordinaire ou des boîtes de gélose lactosée au bromocrésol pourpre. Chaque souche est alorsensemencée sur un bouillon coeur-cerveille (Mérieux) et incubée 24 heures à 37°. Cette culture permet ensuite d'ensemencer par inondation une boîte de gélose ordinaire. Après 18 heures d'incubation à 37°, la culture obtenue à la surface de la boîte est raclée et mise en suspension dans de l'eau distillée.

La suspension obtenue est diluée de façon à obtenir une densité optique (D0) de 0,60 mesurée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 640 nm. Nous obtenons ainsi des suspensions qui contiennent environ :

- 10^9 germes par ml pour Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa
- $5 \cdot 10^8$ germes par ml pour Staphylococcus epidermidis et Acinetobacter

Les suspensions sont ensuite agitées longuement sur un agitateur de type "Vortex", puis réparties dans des petits tubes sous un volume de 2 ml.

II.1.1.2. - Préparation des suspensions de Streptococcus

Les souches sont cultivées deux fois 24 heures à 37° sur boîte de gélose au sang avant chaque essai. Ensuite, chaque souche est ensemencée dans un bouillon tamponné pour Streptocoque (Institut Pasteur) et incubée au bain-marie agité 15 heures à 37°. Cette culture est ensuite centrifugée à 3000 tours/mn pendant 10 mn, elle est lavée deux fois par remise en suspension dans de l'eau distillée et centrifugation pour éliminer toute trace du milieu de culture. Le culot de centrifugation est enfin remis en suspension dans le volume d'eau distillée stérile, nécessaire pour obtenir une D0 de 0,60. Après agitation sur "Vortex", les suspensions sont réparties en petits tubes.

Nous avons adopté cette technique de préparation un peu plus compliquée que la précédente, car les cultures sur milieu gélosé ne nous permettaient pas toujours d'avoir un volume suffisant de suspension contenant le nombre désiré de germes.

La technique utilisée nous a permis d'obtenir des suspensions contenant de $5 \cdot 10^8$ à $1 \cdot 10^9$ germes par ml.

II.1.1.3.- Préparation des suspensions de levures

Après deux cultures de 48 heures à 37° sur boîtes de gélose de Sabouraud, chaque souche est ensemencée dans 10 ml de bouillon de Sabouraud et incubée 18 heures à 37° au bain marie agité (les courbes

de croissance réalisées préalablement, nous ont permis de vérifier que dans ces conditions les levures avaient atteint la phase stationnaire de croissance). La culture est centrifugée à 3000 tours pendant 10 mn et lavée deux fois en eau distillée. La suspension finale est ensuite ajustée à une densité optique de 0,70, ce qui permet d'obtenir de $5 \cdot 10^6$ à $3 \cdot 10^7$ cellules viables par ml. Après agitation sur agitateur "Vortex" les suspensions sont réparties sous un volume de 2 ml dans des petits tubes.

II.1.1.4. - Préparation de suspension de spores de Bacillus pumilus

Des boîtes de gélose ordinaire sontensemencées par inondation avec des cultures de 24 heures à 37° en bouillon coeur-cervelle. Ces boîtes sont incubées à 30° pendant 5 jours. Les cultures sont ensuite raclées à l'aide d'un "Ringar", mises en suspension dans de l'eau distillée et lavées 2 fois par centrifugation et remises en suspension dans de l'eau distillée. La suspension finale est préparée de façon à avoir environ 10^{10} à 10^{11} spores par ml. Les formes végétatives sont éliminées par chauffage de la suspension pendant 20 mn à 80°.

II.1.2. - Préparation des échantillons desséchés

Nous avons travaillé sur deux types d'échantillons :

- échantillons lyophilisés,
- échantillons desséchés sur des feuilles de plastique

II.1.2.1. - Souches lyophilisées

Le but de cette expérimentation était de mesurer l'augmentation de la radiorésistance, lorsque des souches sont irradiées à l'état sec et en absence d'oxygène.

Seules quelques souches de Staphylococci ont été testées dans ces conditions :

- souches de Staphylococcus aureus : 71/02/26
71/02/50
71/02/58
71/02/61
71/02/84

- Souches de Staphylococcus epidermidis : 71/02/85
71/02/88
71/02/92
71/02/95

La technique de préparation a été la suivante : des suspensions en eau distillée ont été préparées selon la méthode décrite précédemment. Ces suspensions ont été réparties ensuite sous un volume de 0,8 ml dans des ampoules en verre puis lyophilisées.

II.1.2.2. - Souches déssechées

Il s'agit ici d'indicateurs biologiques de *Bacillus pumilus* E 601, préparés par répartition, sur des petits carrés de polyéthylène, de 10 mcl d'une suspension en bouillon contenant 5 % de sérum de boeuf. Environ 10^8 germes sont déposés par indicateur. Après dessiccation dans une hotte à flux laminaire pendant quelques heures, les supports sont mis sous double emballage. Nous avons utilisé d'une part des indicateurs préparés dans le laboratoire du Dr Christensen et d'autre part des indicateurs préparés par nous-mêmes à partir de nos suspensions en eau distillée.

II.2. - Irradiations

Elles ont été effectuées le jour même de la préparation des suspensions.

II.2.1. - Irradiateurs

Deux irradiateurs différents ont été utilisés :

- un irradiateur au Cobalt 60
- un irradiateur au caesium 137

II.2.1.1. - Irradiateur au Cobalt 60 *

Cet irradiateur avait, à l'époque où les manipulations ont

* Cet irradiateur appartient à l'Institut de la catalyse ; nous remercions vivement Madame Imlick pour nous avoir permis d'utiliser cet appareil.

été effectuées un débit de dose d'environ 280 Krads par heure. La dosimétrie a été contrôlée avec des dosimètres en verre metaphosphatique. Les doses d'irradiation ont été appliquées avec un pourcentage d'erreur d'environ 5 %.

Des irradiations des souches de Staphylococcus aureus, S. epidermidis et Pseudomonas aeruginosa ont été effectuées dans cet appareil.

II.2.1.2. - Irradiateur au Caesium 137 *

Le reste de nos irradiations ont été faites dans l'irradiateur "Ammonite 407" qui a un débit de dose de 0,7 Mrad/heure. La dosimétrie a été contrôlée plusieurs fois par la méthode de dosimétrie chimique de Fricke.

II.2.2. - Doses d'irradiation délivrées

Les doses d'irradiation appliquées ont été les suivantes :

- Staphylococcus aureus en suspension : 25 - 50 - 75 - 100 Krads
Staphylococcus aureus lyophilisé : 150 - 300 - 450 - 600 Krads
- Staphylococcus epidermidis en suspension : 25 - 50 - 75 - 100
125 et parfois 150 -
175 Krads
- Staphylococcus epidermidis lyophilisé : 150 - 300 - 450 - 600 -
750 Krads
- Streptococcus faecalis et durans : 50 - 100 - 150 - 200 Krads
ou : 25 - 50 - 75 - 100 - 125 -
150 Krads

* Nous exprimons nos vifs remerciements à Mr Emery du CENG pour avoir mis à notre disposition cet irradiateur.

- Streptococcus faecium : 50 - 100 - 150 - 200 - 250 Krads
ou 75 - 150 - 220 - 300 - 375 Krads selon les souches
- Escherichia coli : 10 - 20 - 30 - 40 Krads
- Pseudomonas aeruginosa : 10 - 15 - 20 - 25 - 30 Krads
- Acinetobacter : 25 - 50 - 75 - 100 - 125 Krads
ou 50 - 100 - 150 - 200 - 250 Krads
- levures : 150 - 300 - 450 - 600 Krads
ou 100 - 200 - 300 - 400 - 500 Krads
- Bacillus pumilus en suspension ou desséché :
0,5 - 1 - 1,5 - 2 - 2,5 Mrads
- Bacillus sphaericus desséché : 1 - 2 - 3 - 4 Mrads

II.2.3. - Température d'irradiation

Pour l'irradiateur au Cobalt 60, elle n'a pas été contrôlée avec précision, mais elle était voisine de la température ambiante.

Avec l'irradiateur au caesium 137, toutes les irradiations ont été effectuées à 20° ; la chambre d'irradiation étant maintenue à cette température par circulation d'un liquide réfrigérant. Une sonde de mesure de température placée dans la chambre d'irradiation assurait la régulation de la température du liquide réfrigérant et permettait de connaître à chaque instant la température de la chambre.

II.2.4. - Nombre d'irradiations pour chaque souche

Toutes les souches testées ont été irradiées au minimum 2 ou 3 fois, parfois plus lorsque des discordances étaient apparues dans les premiers résultats.

Pour quelques souches le nombre d'irradiations a été répété un certain nombre de fois, afin d'étudier la reproductibilité des résultats, et la précision de la technique.

C'est ainsi que :

- la souche de Staphylococcus aureus oxford a été irradiée 9 fois,
- la souche de Pseudomonas aeruginosa 414 Lausanne, 6 fois
- la souche d'Escherichia coli 71/05/06, 22 fois.

II.3. - Numérations

Les échantillons irradiés et les échantillons témoins ont été numérés, immédiatement après irradiation dans le cas des préparations microbiennes en suspension et dans les quelques jours suivant l'irradiation pour les préparations desséchés. Ces numérations ont été effectuées de la façon suivante :

- dilutions décimales sériées
- fraction aliquote des dilutions incorporées dans une gélose en **surfusion** ou étalées à la surface d'une boîte de gélose,
- incubation et numération des colonies apparues.

Nous savons que les conditions de culture après irradiation (nature du milieu de culture, température d'incubation) peuvent influencer la capacité des microorganismes à restaurer les lésions induites par l'irradiation et donc modifier les valeurs des radiosensibilités trouvées. Nous avons donc effectué des expériences préliminaires sur quelques souches afin de choisir les conditions de cultures optima.

II.3.1. - Dilutions

II.3.1.1. - Suspensions

Des dilutions décimales, par passage de 1 ml dans des tubes contenant 9 ml de sérum physiologique sont réalisées à partir des suspensions irradiées et des suspensions témoins. Le nombre de dilutions effectuées dépend de la dose reçue et de la souche. A titre indicatif, on peut voir ci-dessous quelques exemples de schémas de dilutions.

- Souche de Staphylococcus aureus 71/02/53

Témoin : dilution jusqu'à 10^{-7}
25 Krads : dilution jusqu'à 10^{-5}
50 Krads : dilution jusqu'à 10^{-4}
75 Krads : dilution jusqu'à 10^{-2}
100 Krads : dilution jusqu'à 10^{-1}

- Escherichia coli n° 71/04/40

Témoin : dilution jusqu'à 10^{-7}
10 Krads : dilution jusqu'à 10^{-6}
20 Krads : dilution jusqu'à 10^{-5}
30 Krads : dilution jusqu'à 10^{-4}
40 Krads : dilution jusqu'à 10^{-3}

- Candida albicans n° 1

Témoin : dilution jusqu'à 10^{-5}
150 Krads : dilution jusqu'à 10^{-4}
300 Krads : dilution jusqu'à 10^{-3}
450 Krads : dilution jusqu'à 10^{-1}
600 Krads : pas de dilution

II.3.1.2. - Echantillons desséchés

Les souches lyophilisées sont remises en suspension en ajoutant 0,8 ml d'eau distillée dans chaque ampoule. Après agitation sur Vortex, les dilutions décimales sont ensuite effectuées.

Les échantillons desséchés sur plastique sont numérotés de la façon suivante :

- les soudures sont découpées à l'aide de ciseaux stériles. Les deux feuillets internes contenant les germes desséchés sont mis dans 5 ml ou 1 ml (selon la dose) de sérum physiologique additionné de 0,1 % de polysorbate 80. Après agitation prolongée afin d'obtenir une suspension bien homogène, les dilutions décimales sont réalisées.

II.3.2. - Mise en culture des dilutions

Pour chaque échantillon 2 ou 3 dilutions sont numérotées en triple exemplaire :

- soit en incorporant 0,1 ml de la dilution à 25 ml de gélose maintenue en surfusion. La gélose est ensuite coulée dans une boîte de Pétri.
- soit en étalant 0,1 ml de la dilution à la surface d'une boîte de gélose.

Nous avons donc pour chaque dose 6 ou 9 boîtes de numération.

II.3.2.1. - Expériences préliminaires pour le choix du milieu de culture optimum

Ces expériences ont été faites avec deux souches :

- souche de Staphylococcus aureus 71/02/24
- souche d'Escherichia coli enteropathogene 71/04/46

Des suspensions en eau distillée ont été préparées, irradiées et diluées selon les techniques précédemment décrites, puis numérotées sur différents milieux.

Les milieux de culture étudiés ont été les suivants :

- gélose trypticase soja
- gélose trypticase soja au sang
- gélose à 5 % de sang de mouton
- gélose trypticase soja + 1 % de glucose
- gélose nutritive : gélose nutritive Mérieux

Il n'a pas été possible, pour chaque essai, de faire une numération en parallèle sur les quatre milieux de culture ; le milieu trypticase soja a été choisi arbitrairement comme milieu témoin et les trois autres milieux ont été étudiés en comparaison avec celui-ci. Les résultats sont présentés dans le paragraphe I (pages 296 à 304).

II.3.2.2. - Milieux de culture utilisés

Nous avons choisi, finalement comme milieu de culture pour réaliser nos numérations bactériennes, la gélose trypticase soja.

Les levures ont été numérotées sur gélose de Sabouraud.

II.3.3. - Températures d'incubation

II.3.3.1. - Expériences préliminaires

Deux techniques d'incubation ont été testées :

- incubation 24 heures à l'étuve à 37° puis 24 h ou 48 heures à la température du laboratoire
- incubation à la température du laboratoire pendant 7 à 10 jours pour Staphylococcus et 4 jours pour E. coli.

Les numérations ont été effectuées en double sur les différents milieux testés et les boîtes ont été incubées selon ces deux techniques. Les résultats figurent pages 296 à 303.

II.3.3.2. - Température d'incubation choisie

Finalement, nous avons choisi pour les numérations bactériennes une incubation de 24 heures à 37° , puis de 24 à 48 heures à la température ambiante.

Pour les levures, les incubations ont été faites 4 jours à 30°.

II.4. - Lecture des résultats

Après incubation, le compte des colonies sur chaque boîte est effectué avec un compteur électronique. Le nombre de germes correspondant à une dilution est obtenu en faisant la moyenne des résultats des 3 boîtes.

Pour chaque dose, une moyenne des résultats de chaque dilution est effectuée. Cependant, nous n'avons pas tenu compte des résultats des dilutions qui donnaient un nombre de colonies par boîtes supérieur à 400 ou inférieur à 20 car le pourcentage d'erreur est alors important.

A titre indicatif, on peut voir dans le tableau ci-dessous un exemple des résultats obtenus et des calculs effectués.

Souche E. coli 71.04.40. Nombres de colonies obtenues à chaque dilution

dilutions doses	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	Moyennes du nom- bre de germes
Témoin						124-107 112	16-12 6	$114 \cdot 10^6$
10 Krads				innom- brables	164-162 164	25- 15 17		$163 \cdot 10^5$
20 Krads			innom- brables	172-175 186	21-20 32			$200 \cdot 10^4$
30 Krads		innom- brables	281-281 272	19-26 31				$269 \cdot 10^3$
40 Krads	innom- brables	154-159 169	21-14 15					$160 \cdot 10^2$

III - COURBES D'INACTIVATION ET DETERMINATION DE LA D10

Le rapport nombre de germes survivants à chaque dose (N) sur nombre de germes à l'origine (No) est calculé. La courbe d'inactivation est tracée en portant en ordonnée la logarithme de N/No et en abscisse les doses.

La D10 est ensuite déterminée graphiquement (voir schéma page 33).

B - R E S U L T A T S

I - EXPERIENCES PRELIMINAIRES POUR LE CHOIX DU MILIEU DE CULTURE ET DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION

Le but de ces expériences préliminaires était de voir si, comme cela a été rapporté dans la littérature, la nature du milieu de culture et la température d'incubation, après irradiation, avaient une influence sur la radiosensibilité des souches testées, afin de choisir pour la suite de notre étude les conditions de culture permettant d'obtenir une radiorésistance maxima.

I.1. - Etude avec la souche de Staphylococcus aureus 71/02/24

Au total le nombre de numérations effectuées dans les différentes conditions se répartit comme suit :

- milieu trypticase soja + sang (TS + sang) = 4 numérations incubées à 37° C et 2 à la température du laboratoire (environ 20°C)
- milieu trypticase soja + glucose (TS + glucose) = 4 essais à 37° C et 3 à 20° C
- milieu gélose nutritive (GN) = 3 essais à 37° C et 3 à 20° C
- milieu trypticase soja (TS) : ce milieu ayant été pris comme milieu de référence, au total 11 numérations ont été faites à 37° C et 9 à 20° C.

Les résultats des numérations ont été lus à 3 jours pour l'incubation à 37° C et à 7 jours pour l'incubation à 20° C, temps nécessaire pour obtenir des colonies de diamètre suffisant, donc facilement comptables.

I.1.1. - Résultats

Les courbes d'inactivation obtenues ont toujours été des droites, quelque soit le milieu de culture utilisé et la température d'incubation. Les D10 correspondantes figurent dans les tableaux LIX et LX. On peut noter que des petites variations de D10 sont observées d'un essai à l'autre. Par contre, pour une même expérience, la D10 obtenue sur le milieu testé est toujours identique à celle obtenue par numération sur milieu trypticase soja.

Tableau LIX : D10* DU STAPHYLOCOCCUS AUREUS 71/02/24 OBTENUES PAR
NUMERATION SUR DIFFERENTS MILIEUX ET INCUBATION A 37°C

EXPERIENCE N°	MILIEU TS	AUTRES MILIEUX	
1	17	17	TS + sang
2	18	18	
3	14,5	14,5	
4	18	18	
5	20	20	TS + glucose
6	18	18	
7	19	19	
8	19	19	
9	14	14	GN
10	16	16	
11	18	18	

* Les D10 sont exprimés en Krads

Tableau LX : D10* DU STAPHYLOCOCCUS AUREUS 71/02/24 OBTENUES PAR
NUMERATION SUR DIFFERENTS MILIEUX ET INCUBATION A 20°C

EXPERIENCE N°	MILIEU TS	AUTRES MILIEUX	
12	17	17	TS + sang
13	15	15	
14	17,5	18,5	TS + glucose
15	18	18	
16	18	18	
17	20	20	
18	14	14	GN
19	17	18	
20	19	19	

* Les D10 sont exprimées en Krads.

Il n'apparaît pas de différence importante des D10 lorsque la température d'incubation varie. En effet, que ce soit à 37° ou à 20°, les D10 oscillent de 14 à 20 Krads et la D10 moyenne est de 17,4 Krads.

La radiosensibilité de la souche de S. aureus étudiée, n'est donc pas modifiée lorsque les conditions de culture varient.

Mais, nous avons remarqué que le milieu de culture peut avoir une influence sur le nombre de germes récupérés. En effet, lorsque l'incubation est faite à 20°, le nombre de colonies est toujours plus élevé sur TS + sang que sur TS et, ceci aussi bien pour la suspension témoin que pour la suspension irradiée.

On peut voir dans le tableau LXI un exemple des résultats obtenus par numération de la même suspension sur TS + sang et sur TS. On constate que le nombre de colonies est 2 à 3 fois plus élevé sur TS + sang. Mais comme cette différence s'observe aussi pour le témoin, le rapport N/No est peu différent, ce qui explique finalement que les D10 soient identiques.

Par contre, lorsque l'incubation a été effectuée à 37°, le nombre de germes décomptés sur TS + sang, TS + glucose et GN a toujours été voisin de celui obtenu sur TS.

I.1.2. - Reproductibilité des déterminations de la D10

Ces expériences nous ont permis, également, d'apprécier la reproductibilité des résultats et la précision de la technique, puisque des numérations répétées ont été effectuées sur gélose trypticase soja. D'un essai à l'autre, la D10 varie de 14 à 20 Krads ; la moyenne arithmétique est de 17,4 Krads et l'écart type de 1,7 Krads.

Les techniques utilisées nous permettent donc de calculer la D10 avec une précision de $\pm 3,4$ Krads. Cette observation nous sera utile, dans la suite de notre travail, pour l'analyse des résultats de radiosensibilité des différentes souches de Staphylococcus aureus étudiées.

I.2. - Escherichia coli

Deux numérations sur chaque milieu et aux deux températures d'incubation ont été effectuées, avec toujours en parallèle, une numération sur gélose TS pour avoir un élément de comparaison.

Tableau LXI : STAPHYLOCOCCUS AUREUS : RESULTATS D'UNE NUMERATION SUR
GELOSES TRYPTICASE SOJA ET TRYPTICASE SOJA + SANG APRES INCUBA-
TION A 20°

Doses	Trypticase soja		Trypticase soja + sang	
	Nombre de germes par ml	N/No	Nombre de germes par ml	N/No
0	$7,7 \cdot 10^7$		$2,6 \cdot 10^8$	
25 Krads	$2,4 \cdot 10^6$	$3,1 \cdot 10^{-2}$	$9,4 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^{-2}$
50 Krads	$1 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^{-3}$
75 Krads	$4,4 \cdot 10^3$	$5,8 \cdot 10^{-5}$	$8 \cdot 10^3$	$3,3 \cdot 10^{-5}$
100 Krads	$1,4 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^{-6}$	$3,3 \cdot 10^2$	$1,4 \cdot 10^{-6}$
125 Krads	$2 \cdot 10^1$	$2,6 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^1$	$1,6 \cdot 10^{-7}$

I.2.1.-D10 obtenues

Dans tous les cas, les courbes d'inactivation ont été des droites. Les D10 calculées à partir de ces courbes sont portées dans les tableaux LXII et LXIII, pages 302 et 303.

Quelle que soit la température d'incubation, il n'est pas apparu de différence entre les D10 obtenues sur trypticase soja et celles obtenues sur les trois autres milieux. La nature du milieu de culture n'a donc pas d'influence sur la radiosensibilité de la souche. Par contre, comme précédemment, des variations de D10 sont observées entre les différentes expériences.

Ainsi, lorsque l'incubation est faite à 37°, la D10 varie de 12 à 17 Krads avec une moyenne de 14 Krads. A 20°, les valeurs de la D10 oscillent entre 11 et 15 Krads et la D10 moyenne est de 13,6 Krads. Cette différence entre les D10 moyennes étant très faible n'apparaît pas comme significative et il est permis de conclure que la température d'incubation ne modifie pas la radiosensibilité de la souche. Enfin, pour E. coli, le nombre de germes numérés à partir d'une même suspension est le même quelque soit le milieu de culture et la température d'incubation utilisés.

I.2.2. Reproductibilité des résultats

Comme précédemment, nous pouvons apprécier la précision de détermination de la D10.

A 37°, la D10 est comprise entre 12 et 17 Krads. La moyenne arithmétique est de 14 Krads et l'écart type de 1,5 Krads. Toutes les valeurs trouvées sont comprises dans un intervalle de 2 écarts types de part et d'autre de la moyenne.

Donc la précision de détermination de la D10 est de ± 3 Krads.

I.3. Conclusions et discussion

Les résultats obtenus ont montré que les quatre milieux de culture étudiés et les deux températures d'incubation testées ne modifiaient pas la radiosensibilité des deux souches étudiées.

Finalement, pour le reste de notre expérimentation, nous avons choisi de réaliser nos numérations bactériennes sur gélose trypticase soja

Tableau LXII : D10 de l'ESCHERICHIA COLI 71/04/46 OBTENUES PAR
NUMERATION SUR DIFFERENTS MILIEUX ET INCUBATION A 37°

EXPERIENCE N°	MILIEU TS	AUTRES MILIEUX	
1	12,5	12	TS + sang
2	17	17	
3	14	14	TS + glucose
4	14,5	14,5	
5	14	14	GN
6	12,5	12,5	

Les D10 sont exprimées en Krads.

Tableau LXIII : D10 DE L'ESCHERICHIA COLI 71/04/46 OBTENUES PAR
NUMERATION SUR DIFFERENTS MILIEUX ET INCUBATION A 20°

EXPERIENCE N°	MILIEU TS	AUTRES MILIEUX	
7	15	15	TS + sang
8	13,5	13,5	
9	11,5	11,5	TS + glucose
10	14	14	
11	11	11	GN
12	15	15	

Les D10 sont exprimées en Krads.

avec incubation à 37°. Nous avons retenu la gélose trypticase-soja parce que c'est un milieu facile à préparer et qui permettait de cultiver toutes les souches microbiennes que nous voulions étudier. Nous avons choisi la température d'incubation de 37° parce que les résultats étaient obtenus en 3 jours alors qu'à 20°, il fallait 4 à 7 jours pour pouvoir compter avec fiabilité les colonies.

De nombreux auteurs, entre autres Stapleton et Coll. (307), Alper et Gillies (11), Adler et Hardigree (2), Freeman et Bridges (131) ont montré que les conditions de culture après irradiation pouvaient modifier la radiosensibilité des souches étudiées. Un tel phénomène a été mis en évidence avec certaines souches d'E. coli, en particulier E. coli B/r et E. coli B, mais n'a pas été retrouvé pour toutes les souches (2 - 11). Pour E. coli, nos résultats ne sont donc pas en contradiction avec ceux relevés dans la littérature.

Pour Staphylococcus aureus, Freeman et Bridges (131) ont montré que des numérations sur gélose nutritive, gélose nutritive au glucose et gélose nutritive au sang donnaient des fractions survivantes croissantes à partir d'une même suspension, ce qui aboutissait à une modification de la radiorésistance.

Nous n'avons pas obtenu de résultats semblables puisque seules les cultures sur gélose au sang incubées à 20°, donnent un nombre de colonies plus élevé. Mais ceci se produit aussi pour les germes non irradiés, si bien que la radiorésistance ne se trouve pas modifiée.

II - RADIOSENSIBILITE DES SOUCHES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

II.1. - Radiosensibilité en milieu liquide

II.1.1. Staphylococcus aureus souche Oxford

Avant d'étudier les souches sauvages, nous avons déterminé, à plusieurs reprises, la radiosensibilité de la souche Oxford dans le but :

- d'une part de connaître, dans les conditions expérimentales choisies, la radiosensibilité d'une souche de collection, afin d'avoir un élément de comparaison pour l'étude des souches sauvages,
- d'autre part de compléter l'étude précédente sur l'évaluation de la précision de détermination des D10.

Au total, la radiosensibilité de cette souche a été déterminée 9 fois. La courbe de survie a toujours été trouvée linéaire et les D10 obtenues figurent dans le tableau suivant :

Tableau LXIV : Radiosensibilité de S. aureus souche Oxford

Expérience n°	D10 en Krads
1	17
2	15
3	15
4	15
5	16
6	16
7	15
8	14
9	14

La D10 varie donc entre 14 et 17 Krads. La moyenne arithmétique est de 15,2 Krads avec un écart type de 0,9 Krad.

Toutes les valeurs trouvées sont comprises dans un intervalle de + ou - 2 écarts types de part et d'autre de la moyenne, c'est à dire entre 13,4 Krads et 17 Krads.

Les variations sont donc moins importantes que pour la souche sauvage précédemment étudiée, puisque l'écart type trouvé était de 1,7 Krad.

II.1.2. - Souches sauvages de S. aureus

Les courbes d'inactivation ont été trouvées linéaires pour la plupart des souches, cependant quelques unes étaient sigmoïdes avec un léger épaulement. On peut voir sur la figure n° 20 quelques unes de ces courbes, en particulier celle de la souche la plus sensible et celle de la plus résistante. Sur cette figure sont présentées, également, quelques courbes correspondant à des souches de sensibilité intermédiaire et un exemple de courbe sigmoïde, page 309.

A partir des courbes d'inactivation, les D10 ont été calculées. Chaque fois qu'une différence de D10 a été observée pour une même souche, une courbe globale a été tracée avec les points de toutes les déterminations, de façon à obtenir la courbe la plus probable en éliminant les points aberrants. Cette courbe globale a permis de calculer la D10 moyenne de chaque souche.

Sur le tableau LXV figure l'ensemble des résultats obtenus. Les souches sont classées par ordre de D10 croissante, pages 307-308.

II.1.2.1. - Comparaison des radiosensibilités entre la souche de collection et les souches sauvages

On constate que les D10 moyennes varient de 12 à 21 Krads. Nous avons vu que la D10 de la souche Oxford varie entre 13,4 et 17 Krads.

Parmi les 34 souches sauvages étudiées, 25 ont une D10 qui est comprise dans cet intervalle et ont donc une radiosensibilité semblable à celle de la souche de collection.

Tableau LXV : D10 DES SOUCHES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

(classées par ordre croissant)

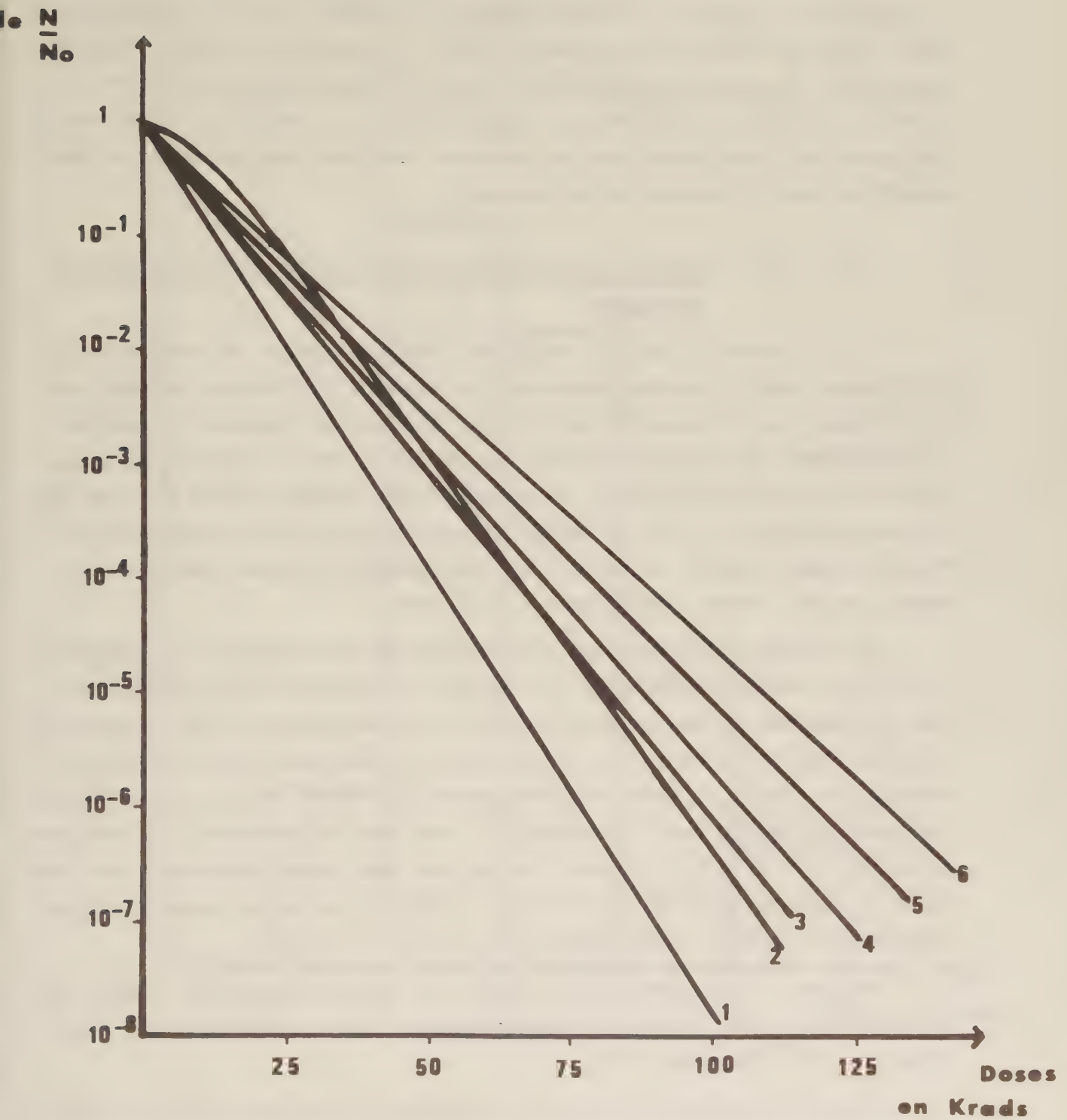
SOUCHES N°	D10 OBTENUES EN Krads	D10 MOYENNE EN Krads *	EPAULEMENT MOYEN EN Krads *
71/02/52	11 - 13	12	-
71/02/55	13 - 14 - 13	13	15
71/02/63	13 - 14	13,5	7
71/02/22	13,5 - 14,5	14	-
71/02/26	14 - 14 - 13	14	-
71/02/30	13 - 14	14	-
71/02/49	14 - 14	14	-
71/02/56	13 - 14	14	-
71/02/61	14 - 14	14	10
71/02/23	14 - 15 - 14	14,5	5
71/02/83	14,5 - 14,5	14,5	-
71/02/19	15 - 15	15	-
71/02/32	15 - 16	15	-
71/02/54	15 - 15	15	-
71/02/20	15 - 16	15,5	-
71/02/27	14,5 - 15,5	15,5	-
71/02/17	15,5 - 16,5	16	-
71/02/21	16 - 16,5	16	8

* Les valeurs ont été calculées à partir des courbes "moyennes" obtenues avec les points de toutes les déterminations.

Tableau LXV (Suite) : D10 DES SOUCHES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS
(classées par ordre croissant)

SOUCHES N°	D10 OBTENUES EN Krads	D10 MOYENNE EN Krads	EPAULEMENT MOYEN En Krads
71/02/82	16 - 16	16	-
71/02/28	16 - 17	16,5	-
71/02/25	15 - 19 - 15	17	-
71/02/31	17 - 17	17	-
71/02/53	17 - 17	17	-
71/02/59	19 - 16	17	-
71/02/60	16,5 - 17,5	17	-
71/02/62	15 - 19 - 17	17	-
71/02/64	18 - 16,5	17	-
71/02/24	16 - 18 - 18	18	-
71/02/51	18 - 19	18,5	-
71/02/29	19 - 19	19	-
71/02/57	18,5 - 19,5	19	-
71/02/84	16 - 19 - 20	19	-
71/02/50	20 - 22 - 19	20	9
71/02/58	21 - 21	21	-

Figure 20 : Courbes de survie de quelques souches de

Staphylococcus aureus

1 : 71/02/52

4 : 71/02/24

2 : 71/02/61

5 : 71/02/62

3 : 71/02/82

6 : 71/02/58

Deux souches ont une D10 moyenne inférieure à 13,4 Krads (12 et 13 Krads) et 7 ont une D10 supérieure à 17 Krads (18 à 21 Krads). Mais, lors de l'étude préliminaire avec la souche 71/02/24, il est apparu que la marge d'imprécision dans la détermination de la D10 pouvait atteindre $\pm 3,4$ Krads. Compte tenu de ce fait, il n'est donc pas possible d'affirmer que ces souches sont plus résistantes ou plus sensibles que la souche de collection.

II.1.2.2. - Variations des radiosensibilités entre les souches sauvages.

Il n'apparaît pas de variation très importante de radiosensibilité entre ces 34 souches sauvages, puisque la différence maximum est de 9 Krads. La D10 moyenne est de 15,2 Krads. La figure n° 21 montre l'histogramme de répartition des D10. Celui-ci revêt presque la forme d'une distribution de Gauss. La majorité des souches (soit 24) ont une D10 comprise entre 14 et 18 Krads. Le nombre de souches ayant une D10 élevée (supérieure à 18 Krads) est plus grand que celui des souches ayant une D10 basse (inférieure à 14 Krads).

Le tableau LXVI regroupe les souches en fonction de leur sérotype et de leur antibiorésistance. Il permet de constater qu'il n'existe pas de relation évidente entre sérotype et radiosensibilité. L'analyse ne peut être faite valablement que pour 5 sérotypes, pour les trois autres, le nombre de souches correspondantes étant trop faible. Seules les souches appartenant au sérotype I ont une radiosensibilité homogène avec une D10 de 15 à 16 Krads. Les autres sérotypes regroupent des souches de radiosensibilité différente ; l'écart entre la souche la plus sensible et la plus résistante varie de 4 à 8 Krads.

De même, il ne semble pas exister de relation entre le niveau de radiorésistance et l'antibiorésistance, sauf pour les souches de sérotype I - II. (voir page 312).

Enfin, les souches qui sont dépourvues de protéine A ou de polysaccharide A (voir tableau IL, pages 259 à 262) n'ont pas un profil de radiorésistance particulier.

Figure 21 : Fréquence de répartition des souches de *S. aureus* en
fonction de la D10

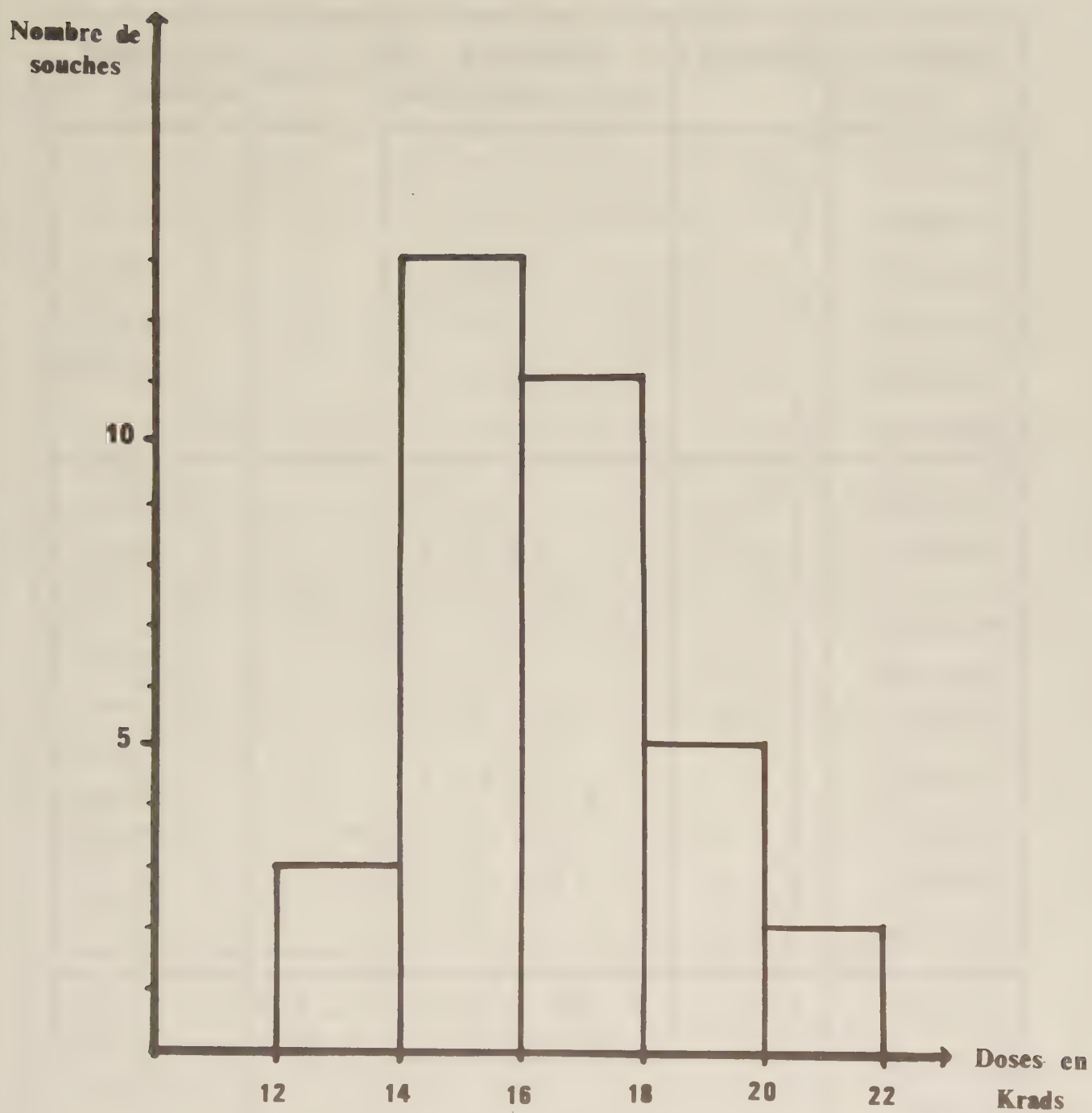


Tableau LXVI : RADIOSENSIBILITE DES S. AUREUS EN FONCTION DU SEROTYPE
ET DE L'ANTIBIORESISTANCE

SOUCHES N°	SEROTYPE	RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	D10 MOYENNE en Krads
71/02/19	I	P - S	15
71/02/32	I	P	15
71/02/27	I	P - A - S	15,5
71/02/17	I	P	16
71/02/21	I	P - A - S	16
71/02/82	I	-	16
71/02/20	II	-	15,5
71/02/51	II	P - T - S	18,5
71/02/52	I - II	P	12
71/02/26	I - II	-	14
71/02/56	I - II	P - A	14
71/02/53	I - II	P - N - T	17
71/02/62	I - II	P - A - T - S - E	17
71/02/57	I - II	P - A - T - S - E	19
71/02/84	I - II	P - A - T - S - C	19
71/02/63	III	P - DP- OX- A - T - S - E - C	13,5
71/02/22	III	P - A - T - S - K - N - E	14
71/02/61	III	P - A - T - S - E - L	14
71/02/29	III	P - A - T	19

Tableau LXVI (suite) : RADIOSENSIBILITE DES S. AUREUS EN FONCTION DU
SEROTYPE ET DE L'ANTIBIORESISTANCE.

SOUCHES N°	SEROTYPE	RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	D10 MOYENNE en Krads
71/02/30	18	P - DP- OX- A - T - S - E - C	14
71/02/54	18	P - DP- OX- A - T - S - E - C	15
71/02/28	18	P - DP- OX - A - T - S - E - C	16,5
71/02/59	18	P - DP- A - T - S - E	17
71/02/24	18	P - DP- OX- T - S - K - E - L	18
71/02/23	14 - 18	P - DP - OX - A - T - S - E - C	14,5
71/02/25	14 - 18	P - DP - A - T - S - E - C	17
71/02/31	14 - 18	P - DP- OX - A - T - S - E - C	17
71/02/49	III - 14-18	P - DP- OX - A - T - S - E - L	16
71/02/55	11	-	13
71/02/83	11	P - A	14,5
71/02/60	11	T	17
71/02/58	11	P	21
71/02/64	0	S	17
71/02/50	0	P - DP - A - T	20

II.2. - Radiosensibilité de *S. aureus* déterminée à l'état sec

Cette étude a été réalisée sur 5 souches lyophilisées. Une courbe globale a été tracée avec tous les points obtenus pour une même souche, de façon à calculer la D10 moyenne. Les résultats figurent dans le tableau suivant

Tableau LXVII : Radiosensibilité de quelques souches de *S. aureus* irradiées à l'état sec.

Souches n°	D10 moyennes en Krads	Epaulement moyen en Krads	Rappel de la D10 en milieu liquide
71/02/26	100	-	14
71/02/50	114	-	20
71/02/58	136	-	21
71/02/61	100	25	14
71/02/84	75	40	19

On constate que la radiorésistance de ces souches est nettement augmentée lorsque l'irradiation est faite à l'état sec et en anaérobiose. Les D10 des souches 71/02/26 et 71/02/61 qui étaient en eau distillée de 14 Krads passent à 100 Krads. Les souches 71/02/50 et 71/02/58, qui avaient les D10 les plus élevées précédemment, sont également à l'état sec les plus résistantes.

Par contre, la souche 71/02/84 qui avait en eau distillée une D10 assez élevé (19 Krads), a à l'état sec la D10 la plus faible. Cependant, la courbe de survie présente un épaulement important, phénomène que nous n'avions pas observé lors de l'étude précédente.

II.3. Discussion des résultats

Koh et Coll. (203), Erdman et Coll. (124), Powel et Bridges (264) qui ont étudié la radiosensibilité de souches de *S. aureus* irradiées

en suspension (dans de l'eau distillée, du tampon ou du sérum physiologique) ont trouvé des D10 de 16 à 18 Krads.

Nous obtenons pour la souche de S. aureus Oxford une D10 de 15,2 Krads $\pm$ 1,8 Krad, nos résultats sont donc en concordance avec ceux de ces différents auteurs.

Les 34 souches sauvages de S. aureus que nous avons étudiées ont des D10 comprises entre 12 et 21 Krads, lorsqu'elles sont irradiées en suspension dans de l'eau distillée.

L'étude statistique réalisée sur la précision de détermination des D10 permet de conclure que la radiosensibilité des souches sauvages est peu différente de celle de la souche de collection.

Les variations de D10 entre les 34 souches sauvages sont relativement faibles, l'espèce S. aureus semble donc homogène sur le plan de la radiosensibilité. Ceci corrobore les travaux de Erdman et Coll. (124) et Anellis et Coll. (20) qui n'avaient observé aucune différence de radiosensibilité entre 6 souches.

Enfin, nous avons obtenu des D10 comprises entre 75 Krads et 136 Krads pour 5 souches irradiées à l'état sec. Ces valeurs sont un peu plus faibles que celles rapportées par Christensen (67) et Ahn et Coll. (4) qui variaient de 140 à 170 Krads.

III. RADIOSENSIBILITE DE STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS

III.1. - Radiosensibilité en milieu liquide

Les courbes de survie obtenues sont sigmoïdes avec un épaulement plus ou moins important. La figure 22 montre quelques exemples de courbes de survie et en particulier celle ayant l'épaulement le plus important (71/02/88) (voir page 317).

De même que pour S. aureus, une courbe globale a été tracée avec tous les points de toutes les déterminations. La D10 moyenne et l'épaulement moyen ont été calculés à partir de cette courbe. Pour 2 souches 71/02/116 et 71/02/93, il n'a pas été possible d'obtenir une courbe globale.

L'ensemble des résultats figure dans le tableau LXVIII, page 318.

III.1.1. - Variation de radiosensibilité entre les souches

Les D10 des 14 souches étudiées varient de 17 à 29 Krads.

Les épaulements sont compris entre 12 et 60 Krads.

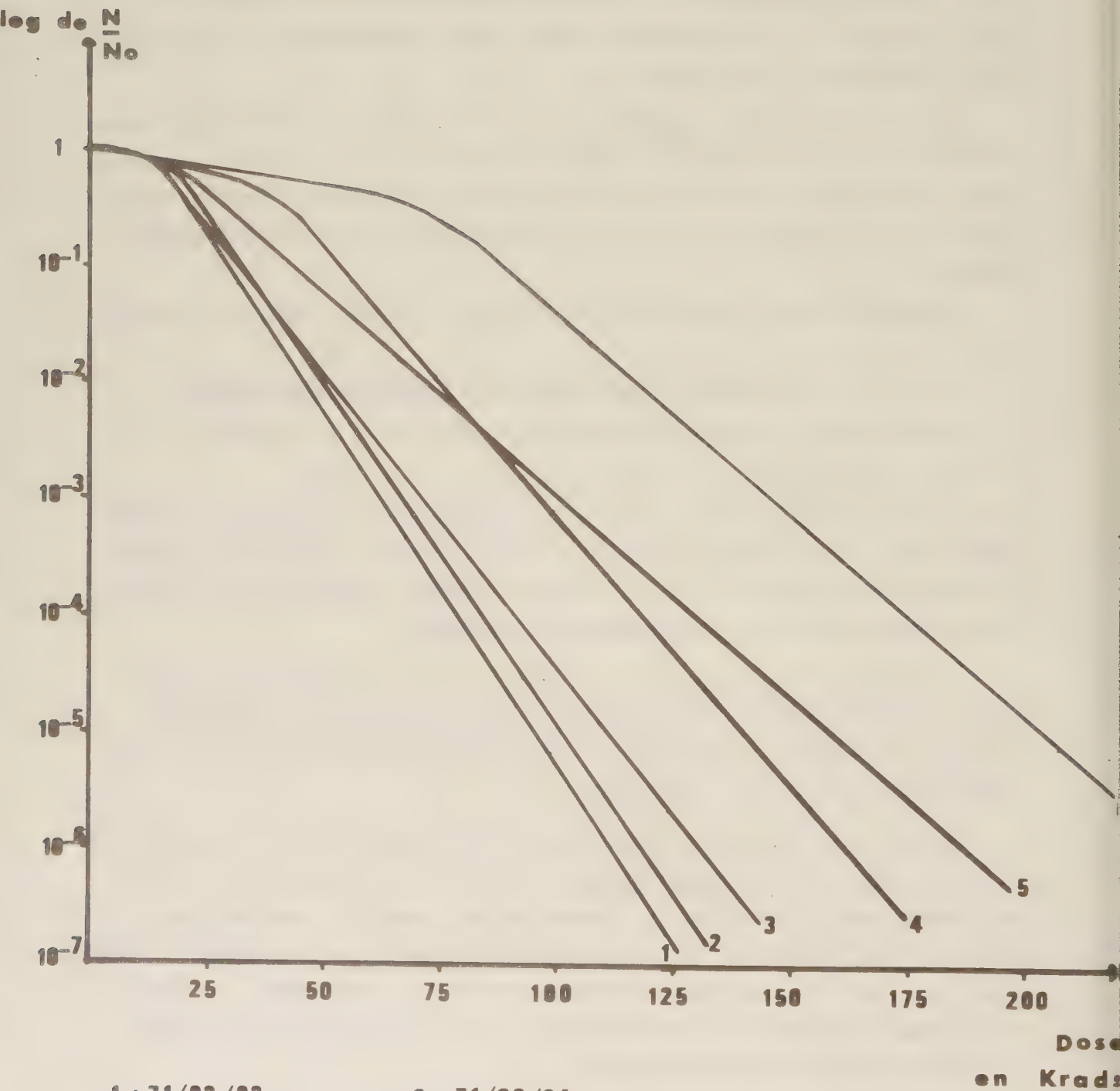
Pour une même souche, les valeurs des épaulements sont parfois différentes entre deux déterminations. C'est notamment le cas des souches 71/02/92 et 71/02/116. Pour la souche 71/02/93, l'épaulement n'a pas été retrouvé lors de la deuxième détermination.

La fréquence de répartition des souches en fonction de la D10 est présentée dans la figure 23. On constate que cette répartition est assez dispersée, cependant un tiers des souches (35,7 %) ont une D10 comprise entre 20 et 22 Krads.

Mais, pour faire une comparaison plus valable des radiosensibilités des souches de S. epidermidis, il faut tenir compte de la valeur de l'épaulement. En effet, la figure n° 22, page 317 montre que la souche 71/02/88 est en fait plus radiorésistante que la souche 71/02/89 alors que les D10 sont respectivement de 25,5 et 29 Krads. De même la souche 71/02/94 est plus résistante que la souche 71/02/86 alors que leurs D10 sont peu différentes.

En calculant pour chaque souche la dose d'irradiation correspondant à un facteur d'inactivation donné, il est alors possible d'évaluer

Figure 22: Courbes de survie de quelques souches de

Staphylococcus epidermidis

1 : 71/02/92

4 : 71/02/94

2 : 71/02/96

5 : 71/02/89

3 : 71/02/86

6 : 71/02/88

Dose
en Krads

Tableau LXVIII : D10 ET EPAULEMENTS En KRADS DES SOUCHES DE
S. EPIDERMIDIS

SOUCHES N°	D 10	EPAULEMENT	D10 MOYENNE	EPAULEMENT MOYEN
71/02/92	13 - 17 - 19	30 - 12 - 10	17	13
71/02/96	20 - 18	15 - 17	18,5	15
71/02/116	19 - 19	12 - 25	19	12 - 25
71/02/86	18 - 22	13 - 13	20	13
71/02/90	21 - 21	15 - 15	21	15
71/02/95	20 - 21 - 20	16 - 15 - 19	21	15
71/02/85	21 - 23	30 - 30	21	35
71/02/94	19 - 21 - 25	36 - 30 - 25	21,5	32
71/02/93	25 - 26	29 - 0	25,5	0 - 29
71/02/88	24 - 27	67 - 62	25,5	60
71/02/91	26 - 26	10 - 13	26	11
71/03/94	25 - 27	25 - 22	26	20
71/03/95	26 - 30	12 - 15	26	17
71/02/89	29 - 30	15 - 15	29	15

Figure 23 : Fréquence de répartition des souches de *S.epidermidis*
en fonction de la D10

Nombre de souches

7

6

5

4

3

2

1

16

18

20

22

24

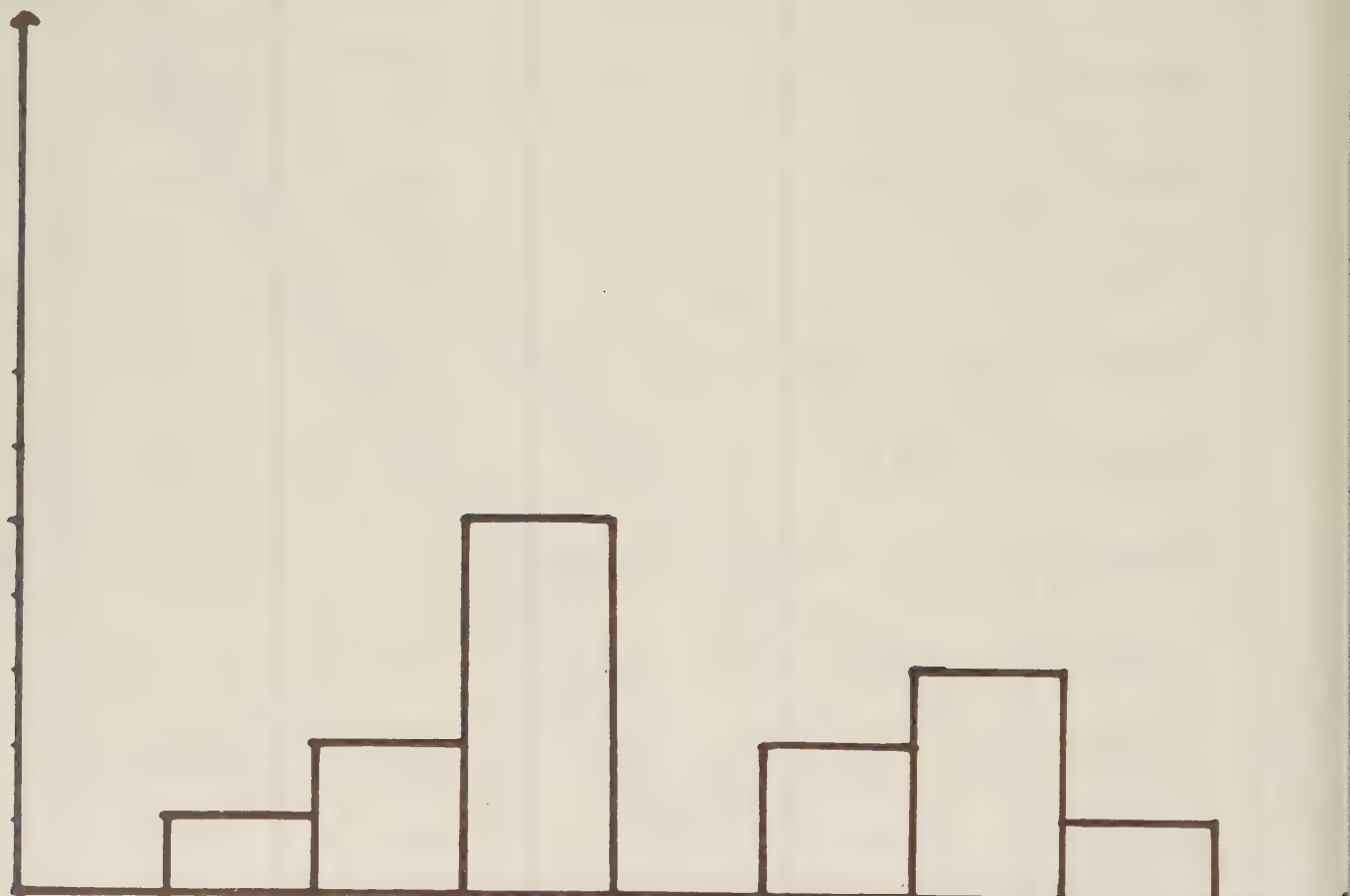
26

28

30

D10

en Krads



de façon plus précise la radiosensibilité. Dans le tableau LXIX, page 321, les souches sont classées en fonction de la dose minima qui donne une inactivation de 10^8 germes. Ce tableau montre que la répartition des souches entre les différents niveaux de résistance est alors différente.

Nous avons recherché s'il existait une relation entre l'appartenance à un sérotype ou à un biotype et le niveau de radiorésistance de ces souches. Les tableaux LXX et LXXI montrent qu'aucune relation ne peut être mise en évidence, mais cette analyse est limitée par le faible nombre de souches sérotypables ou appartenant à certains biotypes.

De même, aucune corrélation n'est apparue entre l'antibiorésistance et la radiorésistance (confert tableau IL, pages 259 à 262).

III.1.2. - Comparaison des radiosensibilités de S. epidermidis et de S. aureus.

Toutes les courbes d'inactivation des souches de S. epidermidis sont sigmoïdes, particularité qui est rarement observée avec les souches de S. aureus.

Ce type de courbe est obtenu dans deux cas :

- lorsque les cellules possèdent plusieurs "cibles" léthales,
- lorsque les cellules sont groupées en amas. Dans ce cas, aux faibles doses, une partie seulement des germes est inactivée et il n'y a pas de diminution du nombre de colonies.

Ce dernier phénomène explique les résultats obtenus avec la souche d'epidermidis 71/02/93. En effet, lors de la première détermination, nous n'avions pas pu préparer une suspension homogène et la courbe de survie a présenté un épaulement important (29 Krads). Par contre, lors de la deuxième détermination, la suspension était parfaitement homogène et l'épaulement n'a pas été retrouvé.

Pour les autres souches de S. epidermidis, nous n'avons pas rencontré de problèmes dans la préparation des suspensions ; cependant, nous nous sommes demandés si elles ne contenaient pas des amas plus importants que celles de S. aureus, ce qui pourrait expliquer la

Tableau LXIX : STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS : DOSES MINIMA EN KRADS
CORRESPONDANT A UN FACTEUR D'INACTIVATION DE 10^8

SOUCHES N°	DOSES EN KRADS
71/02/92	150
71/02/96	165
71/02/116	165 à 177
71/02/86	175
71/02/90	185
71/02/95	185
71/02/85	205
71/02/94	205
71/02/93	205 à 235
71/02/91	220
71/03/95	225
71/03/94	230
71/02/89	250
71/02/88	270

Tableau LXX : STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS : RADIOSENSIBILITE ET
SEROTYPE.

SOUCHES N°	SEROTYPE	DOSES EN KRADS AYANT UN FACTEUR D'INACTIVATION DE 10^8
71/02/92	186	150
71/02/90	186	185
71/02/95	186	185
71/02/94	260	205
71/03/95	260	225
71/02/88	260	270
71/02/96	0	165
71/02/116	0	165 à 177
71/02/86	0	175
71/02/85	0	205
71/02/93	0	205 à 235
71/02/91	autoaggluti- nable	220
71/03/94	0	230
71/02/89	0	250

Tableau LXXI : STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS : RADIOSENSIBILITE ET

BIOTYPE

SOUCHES N°	BIOTYPE	DOSES EN KRADS AYANT UN FACTEUR D'INACTIVATION DE 10^8
71/02/92	1	150
71/02/96	1	165
71/02/86	1	175
71/02/90	1	185
71/02/94	1	205
71/02/89	1	250
71/02/91	2	220
71/03/94	2	230
71/02/116	3	165 à 177
71/02/93	3	205 à 235
71/02/95	4	185
71/02/85	4	205
71/03/95	4	230
71/02/88	4	270

présence des épaulements. Un examen microscopique des différentes suspensions nous a montré qu'il n'en était rien. Par contre, nous avons observé que les cocci de S. epidermidis étaient toujours plus gros que ceux de S. aureus.

Les D10 des Staphylococcus epidermidis sont plus élevées que celles des Staphylococcus aureus puisqu'elles varient de 17 à 29 Krads. La moyenne arithmétique des D10 est de 22,7 Krads pour S. epidermidis et de 15,2 Krads pour S. aureus. Même en tenant compte de l'imprécision de la méthode de détermination des D10, cette différence semble significative.

Les souches de S. epidermidis sont donc plus résistantes que celles de S. aureus, puisque les D10 sont souvent plus élevées et puisqu'on observe un épaulement souvent important. En effet, si l'on compare les doses qui donnent un facteur d'inactivation de 10^8 germes, on constate qu'elles varient de 105 à 170 Krads pour S. aureus et de 150 à 270 Krads pour S. epidermidis.

III.2. - Radiosensibilité à l'état sec

Quatre souches ont été étudiées dans ces conditions. Les valeurs des D10 et des épaulements calculées à partir des courbes globales figurent dans le tableau LXXII. Comme pour S. aureus, il apparaît que la radiorésistance est nettement augmentée, lorsque les souches sont irradiées à l'état sec. En effet, les D10 sont multipliées par un facteur 6 à 7.

On constate par ailleurs que l'épaulement n'est pas retrouvé pour deux souches ; par contre, pour la souche 71/02/88, l'épaulement est très important puisqu'il atteint 250 Krads.

Enfin, la dose nécessaire pour inactiver 10^8 germes est considérablement accrue. Elle est de 1 Mrad pour 3 souches et atteint même 1,7 Mrad pour la souche la plus résistante.

III.3. - Discussion des résultats

Les Staphylococcus epidermidis ont été très peu étudiés jusqu'à présent, puisqu'à notre connaissance aucun résultat détaillé n'a été publié.

Tableau LXXII : RESULTATS DE L'IRRADIATION A L'ETAT SEC DE QUATRE
SOUCHES DE STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS.

SOUCHES N°	D10 MOYENNE en Krads	EPAULEMENT MOYEN en Krads	DOSES EN MRAD DON- NANT 1 FACTEUR D'INACTIVATION DE 10^8 GERMES	RAPPEL D10 en MILIEU LIQUIDE (Krads)
71/02/92	125	0	1	17
71/02/95	132	0	1,05	21
71/02/85	125	50	1,05	21
71/02/88	180	250	1,7	25,5

Il ressort de notre étude que les S. epidermidis sont plus radio-résistants que les S. aureus.

Les D10 sont souvent plus élevées et les courbes de survie ont la particularité d'être sigmoïdes dans la plupart des cas, si bien que les doses qui donnent un facteur d'inactivation de 10^8 germes sont nettement plus élevées pour S. epidermidis. Il est difficile d'expliquer pourquoi les S. epidermidis ont des courbes d'inactivation le plus souvent sigmoïdes alors que celles de S. aureus sont en majorité linéaires. Une des explications possibles était que les suspensions de S. epidermidis contenaient des amas de germes plus importants que celles de S. aureus. Nous avons montré que cela n'était pas le cas, sauf pour une souche. Il se peut donc que les cellules de staphylococcus epidermidis possèdent des cibles léthales multiples. Cependant, Alper et Gillies (cités par Bridges 53) ont montré que l'épaulement n'est pas constant lorsque les conditions expérimentales varient. Nous avons également observé ce phénomène puisque pour deux souches, l'épaulement n'a pas été retrouvé à l'état sec.

S. epidermidis est plus résistant que S. aureus, mais il ne figure pas parmi les germes très radiorésistants.

Christensen a trouvé qu'une dose de 1,5 Mrad donnait un facteur d'inactivation de 10^8 ou plus, pour 99 % des contaminants isolés de prélèvements de poussière et irradiés à l'état sec. L'auteur ne précisait pas quelle était la nature des espèces isolées, mais il devait probablement s'y trouver des S. epidermidis.

Les souches que nous avons étudiées semblent avoir une radiorésistance comparable puisque pour les 4 souches irradiées à l'état sec, un facteur d'inactivation de 10^8 est obtenu avec des doses de 1 à 1,7 Mrad. Mais nos résultats montrent bien que la radiosensibilité varie de façon importante selon que l'irradiation est faite en milieu liquide ou à l'état sec. Les doses minima nécessaires pour inactiver 10^8 S. epidermidis, en suspension dans de l'eau distillée ne dépassent pas 270 Krads. Par contre, à l'état sec, ces doses sont beaucoup plus élevées, puisqu'elles peuvent atteindre 1,7 Mrad.

IV. - RADIOSENSIBILITE DES STREPTOCOCCUS

IV.1. - Streptococcus faecalis

La radiosensibilité de ces dix souches a été étudiée uniquement en milieu liquide.

Des variations dans les résultats ont été observées entre deux déterminations, aussi comme précédemment nous avons essayé d'obtenir la courbe de survie la plus probable en utilisant les points de toutes les déterminations. On peut voir sur la figure n° 24 les courbes d'inactivation de quelques souches.

Dans le tableau LXXIII sont présentés les résultats des D10 et des épaulements obtenus pour chaque détermination et les D10 et épaulements moyens calculés à partir des courbes globales. On constate que les courbes ont le plus souvent une forme sigmoïde, mais l'épaulement est assez faible et n'est d'ailleurs pas toujours retrouvé d'un essai à l'autre.

8 souches ont une D10 comprise entre 14 et 21 Krads, leur radiosensibilité est donc superposable à celle des Staphylococcus aureus.

Deux souches sont nettement plus radiorésistantes puisque leur D10 atteint 37 et 50 Krads. La moyenne arithmétique des D10 est de 22,6 Krads.

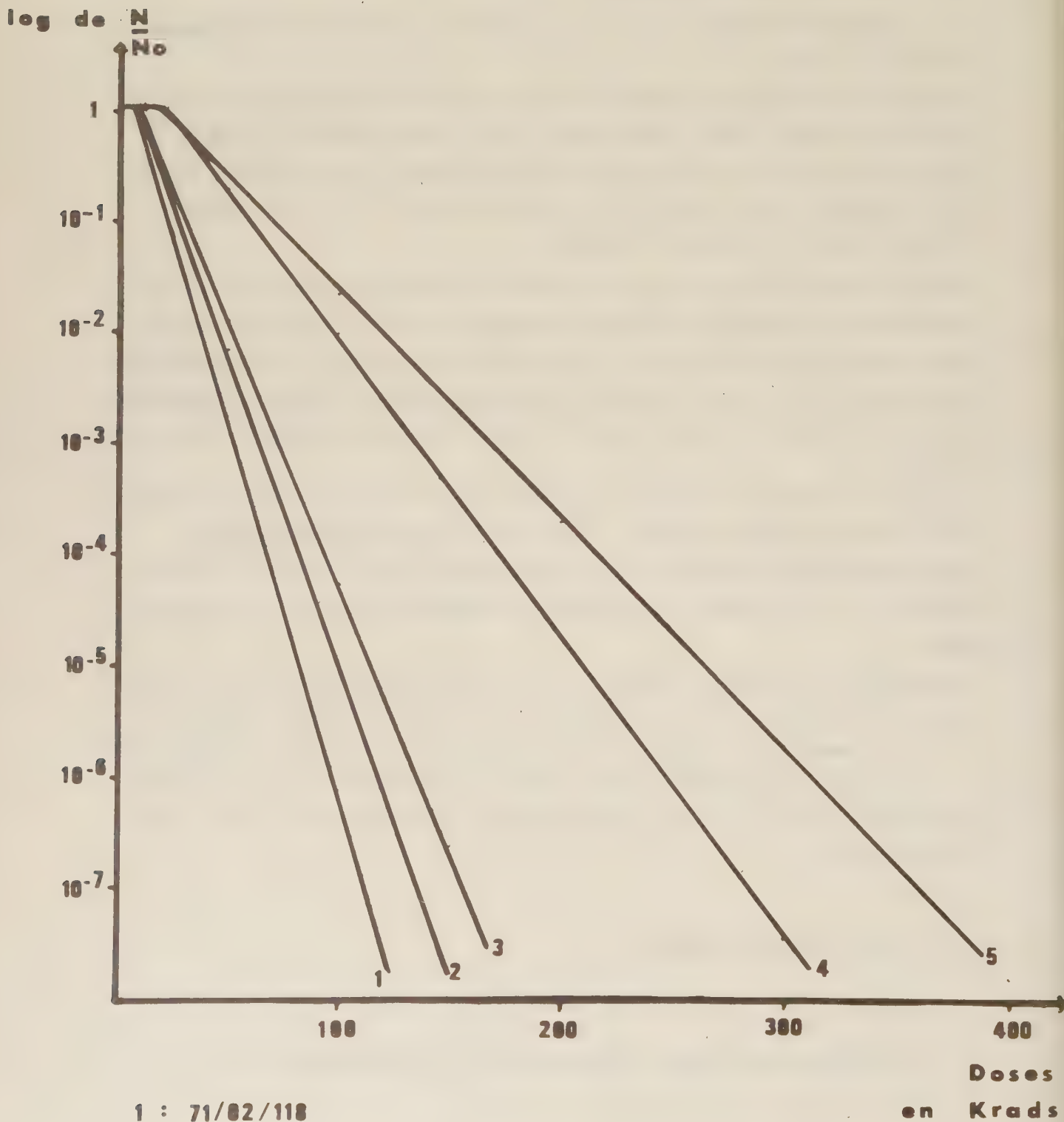
Les doses d'irradiation donnant un facteur d'inactivation de 10^8 germes ont été calculées et figurent dans le tableau LXXIV, page 330.

Pour les huit souches les plus sensibles, ces doses varient dans un intervalle relativement restreint, la moyenne étant de 150 Krads. Par contre, pour les deux autres souches ces doses sont 2 à 3 fois plus élevées.

IV.2. Streptococcus durans

Seules deux souches appartenant à cette espèce ont été étudiées.

Les résultats obtenus figurent dans le tableau page 331.

Figure 24 : Courbes de survie de quelques souches de *S. faecalis*

1 : 71/02/118

2 : 71/02/122

3 : 71/02/117

4 : 71/02/123

5 : 71/02/31

Tableau LXXIII : D10 et EPAULEMENTS * DES STREPTOCOCCUS FAECALIS

SOUCHES N°	D10	EPAULEMENT	D10 MOYENNE	EPAULEMENT MOYEN
71/02/118	14 - 15 - 14	10 - 10 - 15	14	10
71/02/128	18 - 15	0 - 0	16	0
71/02/124	14 - 16 - 17	0 - 0 - 0	16	0
71/06/89	18 - 14	16 - 21	16	16
71/02/122	18 - 19	10 - 12	18	10
71/02/119	17 - 18	28 - 0	19	10
71/02/121	18 - 20 - 22	9 - 9 - 0	19	5
71/02/117	20 - 23	10 - 10	21	10
71/02/123	35 - 40	23 - 25	37	25
71/03/31	47 - 53	14 - 13	50	15

* En Krads.

Tableau LXXIV : STREPTOCOCCUS FAECALIS : DOSES CORRESPONDANT A UN
FACTEUR D'INACTIVATION DE 10^8 GERMES

SOUCHES	DOSES EN Krads
71/02/118	125
71/02/128	130
71/02/124	130
71/06/89	145
71/02/122	155
71/02/121	160
71/02/119	165
71/02/117	180
71/02/123	320
71/03/31	415

Radiosensibilité de 2 souches de Streptococcus durans

SOUCHE N°	D10	EPAULEMENT	D10 MOYENNE	EPAULEMENT MOYEN
71/04/104	19 - 22	11 - 25	20	17
71/04/112	51 - 60	0 - 0		

Pour la dernière souche, il n'a pas été possible de tracer une courbe d'inactivation globale avec les points des deux déterminations. Il apparaît que ces deux souches ont donc une radiosensibilité très différente. La première souche a une D10 correspondant à celles des souches de S. faecalis les plus sensibles. La deuxième a une radiosensibilité légèrement supérieure à la souche de S. faecalis la plus résistante.

IV.3. - Streptococcus faecium

Dans l'ensemble, la reproductibilité des résultats pour ces souches a été relativement médiocre. Les différentes déterminations, pour une même souche, ont donné parfois des résultats différents, les différences portant sur la pente des courbes et même sur la forme des courbes. En effet, dans certains cas, une seule des courbes était sigmoïde ou présentait une forme composite (double exponentielle, page 333).

En utilisant tous les points de chaque détermination, nous avons essayé de tracer la courbe d'inactivation globale, afin de calculer la D10 moyenne. Pour trois souches cela n'a pas été possible, les points étant trop dispersés.

Les courbes de survie obtenues revêtent les 3 formes classiques : exponentielle, sigmoïde et composite. Les courbes sigmoïdes ont un épaulement assez faible. Pour certaines souches, l'épaulement n'a pas été retrouvé pour toutes les déterminations et la courbe globale s'est révélée linéaire.

Quatre souches ont une courbe composite, mais pour trois d'entre elles le nombre de points aux faibles doses était insuffisant pour tracer avec exactitude la première partie de la courbe. La D10 a donc été calculée sur la partie de la courbe ayant la pente la plus faible.

La figure n° 25 page 333 présente un échantillon des courbes d'inactivation en particulier trois courbes composites et les courbes des souches les plus sensibles et les plus résistantes.

Dans le tableau LXXV page 334 figurent l'ensemble des résultats des D10 et des épaulements. On peut constater que les variations de radiosensibilité entre les différentes souches étudiées sont très importantes, puisque les D10 varient de 17 Krads à 118 Krads.

La D10 moyenne est de 54,3 Krads, l'espèce S. faecium est donc plus radiorésistante que l'espèce S. faecalis.

Sur les 17 souches étudiées, quatre ont une D10 comprise entre 17 et 27 Krads, 9 ont des D10 allant de 35 à 63 Krads et 4 ont des D10 atteignant 88 à 118 Krads.

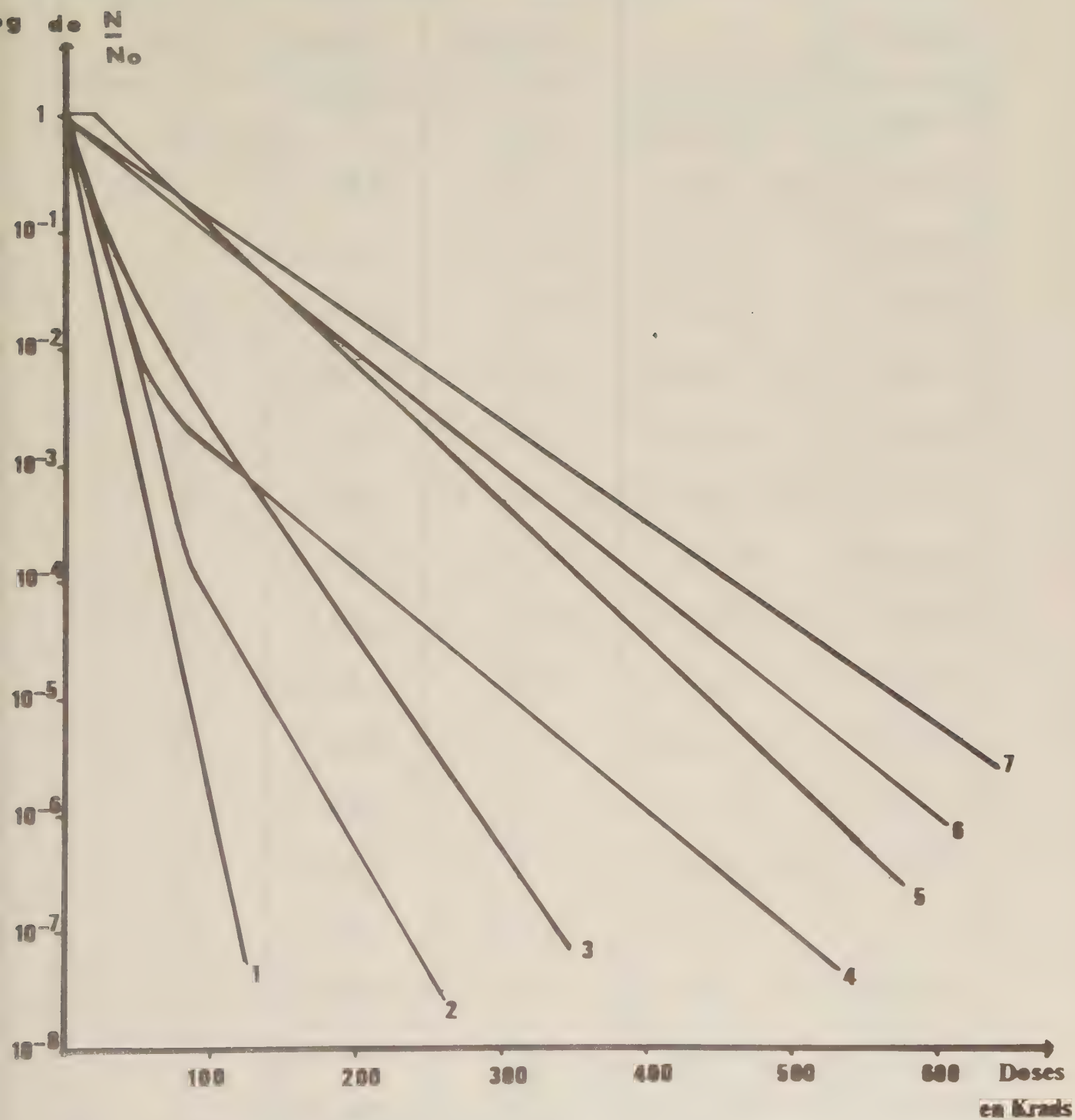
La souche de collection IPP 5431 se place parmi les souches les plus radiosensibles puisque sa D10 est de 27 Krads. La souche A₂1, isolée primitivement dans le laboratoire du Pr Christensen, est connue comme une des souches les plus radiorésistantes lorsqu'elle est irradiée à l'état sec. En milieu liquide, nous avons obtenu pour cette souche une D10 moyenne de 88 Krads.

Mais parmi les 15 souches "hospitalières" étudiées, 3 ont une D10 supérieure. En fait, deux souches sont réellement plus radiorésistantes que la souche A₂1. La troisième (souche 71/06/102) a une courbe composite, ce qui indique qu'une partie seulement de la population est très radiorésistante. La différence de sensibilité entre ces quatre souches est d'ailleurs bien visualisée sur la figure 25, page 333.

Ce dernier point montre donc que, du fait que certaines souches ont une courbe composite, une comparaison précise des radiosensibilités ne peut être faite avec les D10. C'est pourquoi les doses minima qui correspondent à un facteur d'inactivation de 10^8 ont été calculées. Les valeurs trouvées figurent dans le tableau LXXVI, page 335. Il apparaît que la souche 71/06/92 a une radiosensibilité intermédiaire entre les souches 71/06/93 et 71/06/97. Les souches 71/06/100 et 71/06/99 sont plus radiosensibles que la souche 71/06/95. Les doses d'inactivation varient donc de 140 à 945 Krads.

Nous nous sommes demandé pourquoi certaines souches avaient des courbes de survie composites.

Figure 25 : Courbes de survie de quelques souches de

Streptococcus faecium

1 : 71/02/90

5 : A₂1

2 : 71/06/92

6 : 71/06/101

3 : 71/06/100

7 : 71/06/94

4 : 71/06/102

Tableau LXXV : D10 ET EPAULEMENTS DES STREPTOCOCCUS FAECIUM

SOUCHES N°	D10	EPAULEMENTS	D10 MOYENNE	EPAULEMENT MOYEN
71/06/90	14 - 19	0 - 0	17	0
71/06/88	23 - 25 - 31	0 - 0 - 0	26	0
71/06/103	26 - 28	10 - 18	27	14
IPP 5431	25 - 32	20 - 0	27	20
71/06/92	27 - 30 - 45	0 - 0 - 0	25, 49 ^a	0
71/06/93	34 - 36	0 - 0	35	0
71/06/97	32 - 41 - 42	20 - 22 - 0	37	20
71/06/104	36 - 44	18 - 0	42	0
71/06/96	30 - 54	22 - 0	42 ^b	11 ^b
71/06/98	44 - 48	0 - 0	44	0
71/06/100	50 - 54 - 58	0 - 0 - 0	NC, 56 ^a	0
71/06/95	50 - 60	0 - 0	56	0
71/06/99	58 - 60 - 68	0 - 0 - 0	NC, 63 ^a	0
A ₂ ¹	76 - 100	24 - 26	88 ^b	25
71/06/102	90 - 92 - 110	0 - 0 - 0	NC, 96 ^a	0
71/06/101	84 - 104	0 - 34	100	0
71/06/94	106 - 130	0 - 0	118 ^b	0

a = Courbes composites. Dans la plupart des cas, la D10 correspondant à la première partie de la courbe n'a pu être calculée (NC = non calculable).

b = Moyenne arithmétique.

Tableau LXXVI : STREPTOCOCCUS FAECIUM : DOSES MINIMA CORRESPONDANT A
UN FACTEUR D'INACTIVATION DE 10^8 GERMES

SOUCHES N°	DOSES EN Krads
71/06/90	140
71/06/88	210
71/06/103	235
IP 5431	238
71/06/93	270
71/06/92	280
71/06/97	315
71/06/104	335
71/06/96	335
71/06/98	350
71/06/100	400
71/06/99	435
71/06/95	450
71/06/102	600
A ₂ ¹	705
71/06/101	800
71/06/94	945

Ce type de courbe est obtenu lorsque la population est composée de cellules de radiosensibilité différente. L'hétérogénéité peut être d'ordre génétique et dans ce cas il est possible de sélectionner des mutants résistants en repiquant les survivants aux fortes doses ; la courbe de survie obtenue avec ces survivants est alors exponentielle et la pente est la même que celle de la deuxième partie de la première courbe. L'hétérogénéité peut être également d'ordre physiologique ; les survivants aux fortes doses redonnent toujours la même courbe en double exponentielle.

Nous avons donc recherché la présence éventuelle de mutants radio-résistants chez les souches qui avaient des courbes de survie en double exponentielle ; mais cette recherche a toujours été négative.

Enfin, aucune relation entre l'antibiogramme et le niveau de radiorésistance n'a pu être trouvée.

IV.4. - Discussion des résultats

Nous avons déterminé la radiosensibilité en milieu liquide de 10 souches de S. faecalis. Huit ont une D10 comprise entre 14 et 21 Krads, les deux autres sont plus radiorésistantes, leurs D10 étant de 37 et 50 Krads. Ces résultats sont en concordance avec certains de ceux relevés dans la littérature.

Ainsi Erdman et Coll. (124) ont obtenu une D10 de 21 Krads pour une souche irradiée en tampon phosphate. Dharkar (107) a trouvé une D10 de 37 Krads pour une souche étudiée dans les mêmes conditions.

Par contre, Powell et Bridges (264), Placeas et Arizan (254) ont trouvé des D10 plus élevées, puisqu'elles sont respectivement de 70 et 76 Krads.

La plupart des auteurs ont obtenu des courbes de survie linéaires. Les nôtres sont le plus souvent sigmoïdes, mais l'épaule est faible. Il ressort de nos résultats que des différences importantes de radiosensibilité peuvent être trouvées entre les souches de S. faecalis, puisque la D10 de la souche la plus résistante est trois fois plus élevée que celle de la souche la plus sensible. Cependant 8 souches sur 10 ont une radiosensibilité assez voisine, qui est d'ailleurs proche de celle des Staphylococcus aureus.

Nous avons irradié, en eau distillée, 17 souches de Streptococcus faecium et nous avons trouvé des D10 moyennes allant de 17 à 118 Krads. Une comparaison avec les résultats relevés dans la littérature est difficile car le plus souvent les travaux ont été réalisés dans des conditions expérimentales différentes des nôtres (irradiation à l'état sec). Cependant, Matsuyama et Coll. (231) rapportent des D10 de 62 à 120 Krads pour des souches de S. faecium irradiées en tampon ou en bouillon. Ley et Coll. (214) ont trouvé une D10 de 83 Krads pour la souche A₂¹ irradiée en tampon phosphate. Nos résultats sont donc similaires.

La reproductibilité de nos résultats a été assez mauvaise, puisque pour une même souche les écarts de D10 sont quelquefois importants. Mais nous avons remarqué que Matsuyama et Coll. (231) ont rencontré les mêmes difficultés, puisque pour une de leurs souches, les D10 déterminées lors de deux essais successifs sont de 60 et 120 Krads.

La plupart des auteurs ont obtenu des courbes d'inactivation sigmoïdes pour Streptococcus faecium. Nos résultats sont différents puisque la majorité de nos souches (9 sur 17) ont des courbes de survie linéaires. Pour quatre souches seulement, nous avons obtenu une courbe sigmoïde avec un épaulement beaucoup plus faible que ce qui est habituellement cité. Enfin avec les quatre autres souches, les courbes d'inactivation sont composites. Anellis et Coll. (20) ont également obtenu un tel type de courbe.

Christensen et Coll. (68 - 71) ont montré qu'il existait des différences importantes de radorésistance entre les souches de S. faecium, cependant, toutes ont une radorésistance élevée et sont en particulier plus radorésistantes que les souches de S. faecalis. Nous-même avons retrouvé cette hétérogénéité de radiosensibilité de S. faecium puisque les D10 oscillent de 17 à 118 Krads. Par contre, une partie de nos souches ont une radiosensibilité identique à celle des S. faecalis. Seules quatre souches ont une radorésistance très élevée. Parmi elles figure la souche A₂¹ isolée par Christensen et qui est connue comme une des souches de S. faecium les plus résistantes.

L'irradiation en suspension dans de l'eau distillée, nous a donné une D10 moyenne de 88 Krads, résultat très proche de celui de Ley et Coll. (214) obtenu lors d'une étude effectuée dans des conditions

expérimentales voisines. Deux de nos souches "sauvages" semblent plus radiorésistantes puisque leurs D10 moyennes sont de 100 et 118 Krads mais les écarts obtenus entre les deux déterminations ne permettent pas de l'affirmer avec certitude. En tout cas, ces deux souches sont au moins aussi radiorésistantes que la souche A₂¹.

Pour nos quatre souches les plus résistantes, les doses nécessaires pour obtenir un facteur d'inactivation de 10⁸ sont comprises entre 600 Krads et 950 Krads. Les souches de S. faecium sont donc beaucoup plus sensibles lorsqu'elles sont irradiées en suspension aqueuse que lorsqu'elles sont irradiées à l'état sec. En effet, Christensen et Coll. (71) qui ont réalisé toutes leurs études sur des souches desséchées dans du bouillon sérum obtiennent le même facteur d'inactivation avec des doses beaucoup plus élevées. Ces doses atteignent 4 Mrads pour les souches les plus résistantes en particulier la souche A₂¹.

Enfin, nous avons déterminé la radiosensibilité de deux souches de S. durans, espèce qui n'avait pas été étudiée jusqu'alors. Une des souches a une radiorésistance assez faible, l'autre a une radiorésistance de l'ordre de celles des souches de S. faecium, moyennement résistantes.

V - RADIOSENSIBILITE DES ESCHERICHIA COLI

V.1. - Escherichia coli non enteropathogenes

Nous avons déterminé la radiosensibilité en milieu liquide de neuf souches. Pour chaque souche la détermination a été effectuée au minimum trois fois et une courbe d'inactivation globale a été tracée avec tous les points de façon à calculer la D10 extrêmes. Dans tous les cas, les courbes d'inactivation ont été des droites. Un exemple de quelques courbes obtenues est présenté dans la figure n° 26, p.341, notamment celles correspondant aux D10 externes.

Les résultats des D10 de ces neuf souches figurent dans le tableau LXXVII. Dans l'ensemble, la reproductibilité des résultats a été assez bonne, puisque les écarts de D10 entre deux déterminations sont assez faibles. Les D10 moyennes sont comprises entre 6,5 et 14 Krads. Sur ces 9 souches, 5 ont une radiosensibilité très proche, puisque leurs D10 varient de 8,5 à 10 Krads ; une souche apparaît nettement plus radiorésistante que les autres, sa D10 étant de 14 Krads. La moyenne des D10 de ces neuf souches est de 9,5 Krads.

Il ne semble pas exister de relation entre la radiosensibilité et la résistance aux antibiotiques (confert tableau LIV, pages 274 - 275).

V.2. - Escherichia coli enteropathogenes

V.2.1. - Etude statistique de la reproductibilité des résultats pour une souche.

Cette étude nous a paru nécessaire pour comparer valablement les niveaux de radiosensibilité entre les deux groupes d'E. coli étudiés. Une première approche a déjà été réalisée lors de l'analyse des résultats de l'étude sur l'influence du milieu de culture et de la température d'incubation (voir paragraphe I.2. page 299).

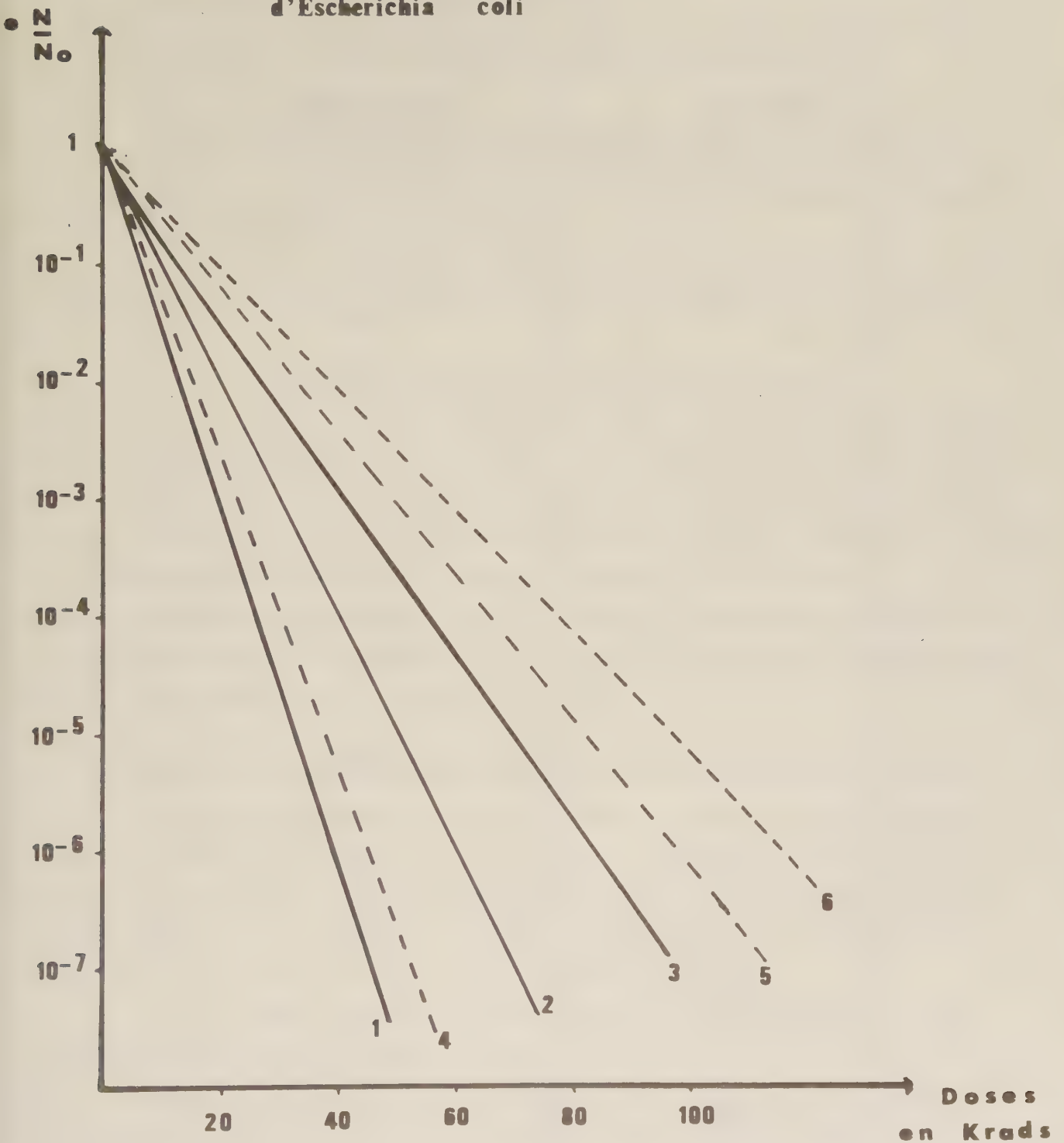
En effet, cette étude effectuée avec le souche d'E. coli enteropathogenes 71/04/46 nous a permis de calculer que la D10 pouvait être déterminée avec une précision de ± 3 Krads.

Nous avons voulu confirmer ce résultat avec une autre souche. Pour cela la souche 71/05/06 a été irradiée 23 fois. Les D10 obtenues figurent dans le tableau LXXVIII, page 342.

Tableau LXXVII : D10 DES ESCHERICHIA COLI

SOUCHES N°	D10 en Krads	D10 MOYENNE en Krads
71/04/38	6 - 5 - 7 - 6,5	6,5
71/04/09	8 - 7 - 7	7
71/04/35	7,5 - 9 - 8 - 11	8,5
71/04/12	11 - 8 - 9 - 8	9
71/04/04	9,5 - 9 - 10	9,5
71/04/34	10,5 - 9 - 9,5	9,5
71/04/03	11 - 9 - 10,5	10
71/04/40	15 - 11,5 - 11 - 8	11
71/03/128	14 - 14 - 14	14

Figure 26 : Courbes de survie de certaines souches

d'*Escherichia coli*

1 : 71/04/38

4 : 119 B14 71/04/65

2 : 71/04/03

5 : 125 B15 71/04/75

3 : 71/03/128

6 : 128 B12 71/04/48

Tableau LXXVIII : E. COLI 71/05/06 : D10 DETERMINEES LORS DE
23 ESSAIS SUCCESSIFS

ESSAIS N°	D10 en Krads
1	10
2	8
3	7
4	8,5
5	9
6	9
7	10
8	9
9	9
10	7
11	8
12	8,5
13	8,5
14	8
15	8,5
16	9,5
17	9,5
18	9,5
19	9
20	8
21	9
22	8,5
23	6,5
Moyenne	8,5
Ecart type	0,9

On constate que d'un essai à l'autre la D10 de la souche varie de 6,5 Krads à 10 Krads. La moyenne est de 8,5 Krads et l'écart type de 0,9.

100 % des résultats trouvés sont compris dans un intervalle de plus ou moins deux écarts types de part et d'autre de la moyenne. Une valeur de D10, prise au hasard, diffère donc de la moyenne au maximum de deux écarts types, soit 1,8 Krads.

Il ressort de l'ensemble de ces résultats que la D10 d'une souche d'E. coli ne peut être calculée qu'avec une précision de 2 à 3 Krads.

V.2.2. - Radiosensibilité des E. coli enteropathogenes

Treize souches ont été étudiées. La D10 moyenne de chaque souche a été calculée à partir de la courbe d'inactivation tracée avec tous les points de chaque détermination. Les courbes de survie ont toujours été des droites, quelques unes sont présentées dans la figure 26, p. 341. Le tableau LXXIX regroupe l'ensemble des résultats des D10. Les D10 moyennes varient de 7,5 à 19 Krads. L'intervalle de variation est donc un peu plus important que pour les E. coli non enteropathogenes. La moyenne des D10 est de 12,3 Krads.

. Comparaison des radiosensibilités entre les deux groupes d'E. coli *****

La moyenne des D10 des E. coli banaux est de 9,5 Krads ; compte tenu du calcul précédent sur la précision de détermination des D10, la différence entre les deux moyennes paraît significative. Il est donc permis de dire que les E. coli enteropathogenes sont dans l'ensemble plus radiorésistants que les E. coli banaux.

Si l'on compare de façon plus détaillée les résultats des deux groupes d'E. coli, on constate que :

- 8 souches d'E. coli banaux, soit 88,8 % ont une D10 inférieure ou égale à 11 Krads ; ce pourcentage est de 46 % pour les E. coli enteropathogenes,

- Par rapport à la souche d'E. coli banale, la plus résistante, 4 souches enteropathogenes, soit 30,7 % ont une radiosensibilité voisine et trois souches, soit 23 % ont des D10 significativement plus élevées.

Tableau LXXIX : D10 DES *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATHOGENES

SOUCHES N°	SEROTYPE	D10 en Krads	D10 moyenne en Krads
71/04/65	119 B14	7,5 - 7 - 7,5	7,5
71/04/69	111 B4	7 - 8 - 7,5	7,5
71/05/06	111 B4	6,5 à 10 ^a	8,5
71/04/66	55 B5	11 - 7,5 - 10 - 8,5	8,5
71/04/79	86 B7 127 B8	10 - 9 - 9	9
71/04/71	26 B6	11 - 10 - 10	10
71/04/45	128 B12 127 B8	12 - 14 - 13 - 14	13
71/04/46	26 B6	12,5 à 17 ^b	14
71/05/08	126 B16	14 - 15 - 13,5 - 15	14
71/04/47	128 B12	14,5 - 13,5 - 14,5	14,5
71/04/75	125 B15	17 - 15,5 - 16 - 17,5	16,5
71/04/73	125 B15	15,5 - 17 - 20 - 20,5	18
71/04/48	128 B12	19 - 22 - 18 - 19	19

a = voir tableau LXXVIII

b = voir résultats paragraphe I.2. (pages 300 à 303)

. Comparaison des radiosensibilités en fonction des sérotypes d'E. coli

enteropathogenes

Seuls quatre sérotypes peuvent être comparés, les D10 des huit souches appartenant à ces 4 sérotypes sont les suivantes :

E. coli 0111 B4 = 7,5 - 8,5 Krads

E. coli 026 B6 = 10 et 14 Krads

E. coli 0128 B12 = 14,5 et 19 Krads

E. coli 0125 B15 = 16,5 et 18 Krads

Sachant que les D10 sont déterminées avec une précision de ± 3 Krads, on peut conclure que les E. coli 0111 B4 et 026 B6 sont plus radiosensibles que les E. coli 0125 B15. Par contre, les différences de radiosensibilités entre sérotypes 0111 B4 et 026 B6, 026 B6 et 0128 B12, 0128 B12 et 0125 B15 ne sont pas significatives.

Le nombre de souches étudiées est restreint, et il n'est pas possible de tirer des conclusions générales. Pour confirmer ces résultats, il serait nécessaire d'étudier un plus grand nombre de souches afin de faire une comparaison statistiquement valable.

V.3. Discussion et conclusion

La littérature est riche de travaux réalisés sur la radiosensibilité des E. coli, cependant les E. coli enteropathogenes n'ont jamais été étudiés jusqu'alors.

Les D10 trouvées varient selon les souches et sont en général comprises entre 2,3 Krads et 16 Krads lorsque l'irradiation est faite dans des conditions semblables aux nôtres. C'est ainsi que Friesen et Coll. (134) ont obtenu des D10 comprises entre 2,3 et 15,3 Krads pour diverses souches d'E. coli K12 irradiées dans du tampon phosphate. Cook et Coll. (85) ont trouvé une D10 de 8 Krads pour la souche d'E. coli NCTC 5833 irradiée en eau distillée. Erdman et Coll. (124 - 125) rapportent des D10 de 6 et 8,3 Kreps pour des souches d'E. coli isolées de denrées alimentaires et irradiées en tampon phosphate.

Nos neuf souches "sauvages" d'E. coli non enteropathogenes ont des D10 comprises entre 6,5 et 14 Krads ; la majorité des souches ayant une D10 inférieure à 11 Krads. Ces résultats ne diffèrent donc pas de ceux relevés dans la littérature et il apparaît que les E. coli isolés en clinique humaine ne sont pas plus radiorésistants que les souches de collection ou d'origine alimentaire.

Les treize souches d'E. coli enteropathogenes que nous avons étudiées ont des D10 comprises entre 7,5 et 19 Krads. Une étude statistique nous a permis de montrer que ce groupe d'E. coli était dans l'ensemble plus radiorésistant que le groupe d'E. coli banaux.

Il est apparu également qu'il existait des différences de radiosensibilité entre les sérotypes ; les souches de sérotype 0111 B4 sont les plus radiosensibles.

La radiosensibilité d'une partie des E. coli enteropathogenes est proche de celle de la souche E. coli B/r, mutant radiorésistant de la souche E. coli B . En effet, les D10 de E. coli B/r, citées dans la littérature, sont toujours supérieures à 10 Krads. Matsuyama et Coll. (231) rapportent une D10 de 21 Krads ; Cramp et Coll. (90 - 92) ont trouvé des D10 de 13,5 et 15 Krads ; pour Shenoy et Coll. (295 - 296), les D10 sont de 12 et 16 Krads.

VI. - RADIOSENSIBILITE DES PSEUDOMONAS AERUGINOSA

VI.1. - Souche 414 Lausanne

La radiosensibilité de cette souche de collection a été déterminée 7 fois. Les courbes de survie obtenues ont toujours été linéaires ; les D10 déterminées lors de ces 7 essais figurent dans le tableau LXXX. On constate que les D10 oscillent de 3,8 à 4,6 Krads. La D10 moyenne est de 4 Krads et l'écart type de 0,275 ; la D10 de cette souche est donc de 4 Krads $\pm$ 0,55.

VI.2. - Souches sauvages

Notre étude a porté sur treize souches. Comme pour la souche de collection, les courbes d'inactivation ont été parfaitement linéaires. La figure n° 27 présente un exemple de quelques courbes obtenues. La reproductibilité des résultats a été très bonne, puisque d'un essai à l'autre, les différences de D10 sont très faibles, voire nulles. Nous n'avons donc pas jugé nécessaire de déterminer une D10 moyenne à partir d'une courbe d'inactivation globale regroupant tous les points des déterminations.

Les valeurs des D10 obtenues sont portées dans le tableau LXXXI. Les D10 de ces treize souches sont comprises entre 2,5 et 5,5 Krads. Il n'y a pas de grandes différences de radiosensibilité entre ces souches. En effet, onze souches ont une D10 comprise entre 3,5 et 4,5 Krads ; une souche est un peu plus radiosensible (D10 = 2,5 Krads) et deux autres sont légèrement plus radiorésistantes.

Si l'on compare ces résultats avec ceux de la souche 414 Lausanne, il apparaît que les onze souches ayant des D10 de 3,5 à 4,5 Krads ont une radiosensibilité superposable à celle de la souche de collection puisque sa D10 est de 4 $\pm$ 0,55 Krads.

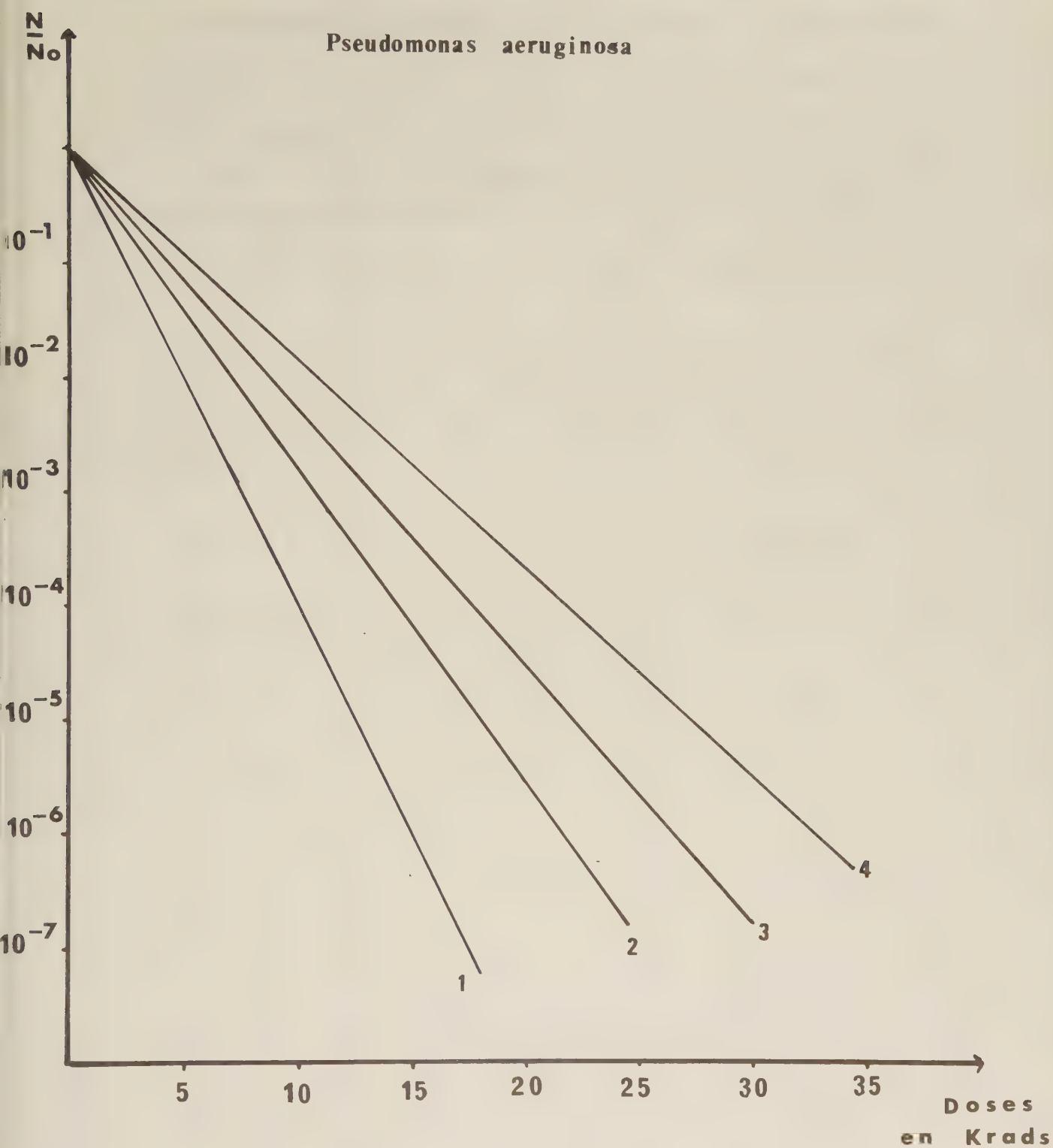
La souche 71/03/88 est plus sensible, tandis que les souches 71/03/48 et 71/03/114 sont plus résistantes que la souche 414 Lausanne.

Il n'y a pas de relation entre l'appartenance à un sérotype et la radiorésistance.

Tableau LXXX : SOUCHE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA 414 LAUSANNE

ESSAIS N°	D10 en Krads
1	4
2	3,8
3	4
4	3,8
5	4,2
6	3,8
7	4,6
Moyenne	4
Ecart type	0,275

Figure 27 : Courbes de survie de quelques souches de

Pseudomonas aeruginosa

1 : 71/03/88

2 : 71/03/123

3 : 71/03/43

4 : 71/03/114

Tableau LXXXI : D10 EN KRADS DES PSEUDOMONAS AERUGINOSA

SOUCHES N°	SEROTYPE	D10
71/03/88	6	2,5 - 2,5
71/03/82	8	3,25 - 3,5
71/03/123	1	3,5 - 3,5
71/03/124	8	3,5 - 3,5
71/03/42	11 - 13	3,5 - 3,5
71/03/85	0	3,75 - 3,75
71/03/33	10	3,5 - 4
71/03/43	11	4 - 4
71/03/39	2	4 - 4,25
71/03/91	8	4 - 4,25
71/03/37	11	4,25 - 4,5
71/03/48	3	5 - 5,25
71/03/114	0	5,5 - 5,5

VI.3. - Discussion des résultats

Les Pseudomonas aeruginosa, irradiés en tampon phosphate ou en eau distillée, ont toujours été trouvés très radiosensibles. Koh et Coll. (203), Bridges (51), Matsuyama et Coll. (231) ont trouvé des D10 de 2,5 à 4,5 Krads. Bonet-Maury (43) a obtenu une D10 de 3,3 Krads pour la souche 414 Lausanne.

Nos résultats concordent donc avec ceux colligés dans la littérature.

Les souches "sauvages" de P. aeruginosa ne sont pas plus radio-résistantes que les souches de collection puisque sur les treize souches étudiées, onze ont une D10 peu différente de celle de la souche 414 Lausanne.

VII. RADIOSENSIBILITE DES ACINETOBACTER

VII.1. - Résultats

8 souches ont été étudiées, trois Acinetobacter lwoffii et cinq Acinetobacter calcoaceticus, parmi elles figurent deux souches de collection.

Comme dans le cas des Streptococcus faecium, nous avons observé un manque de reproductibilité des résultats, portant soit sur les D10, soit même sur la forme des courbes d'inactivation. En effet, pour deux souches, une courbe composite a été obtenue lors d'une détermination alors que pour les autres déterminations, les courbes ont été trouvées linéaires.

Nous avons essayé de tracer les courbes d'inactivation les plus probables en utilisant les points de toutes les déterminations, afin de calculer les D10 moyennes. Mais cela n'a pas été possible avec la souche d'A. lwoffii IPP 5382, car les points étaient trop dispersés. Les courbes moyennes obtenues sont présentées dans la figure 28 , page 353 . Pour la souche IPP 5382, la courbe d'inactivation tracée est une estimation obtenue avec la moyenne arithmétique des D10. On constate que la courbe de la souche 71/07/38 revet une forme composite ; pour les autres souches, les courbes moyennes sont linéaires.

Les D10 obtenues pour chaque détermination et les D10 calculées à partir des courbes moyennes figurent dans le tableau LXXXII, page 354.

Comparaison des radiosensibilités

Les souches d'A. lwoffii ont des D10 moyennes comprises entre 17 et 23 Krads. En se basant sur ces valeurs, on pourrait croire que les deux souches sauvages sont plus radiorésistantes que la souche de collection. En fait, pour cette dernière souche, les différences de D10 entre les déterminations ont été très importantes et à deux reprises nous avons obtenu des valeurs de 23 Krads ; on ne peut donc pas affirmer qu'elle est plus radiosensible.

Les D10 des 4 souches d'A. calcoaceticus varient de 30 à 52 Krads, la souche de collection étant la plus radiosensible. La 5ème souche (71/07/38), dont la courbe de survie est composite, est moins résistante. Comme cela apparait sur la figure n° 28 , on constate que cette

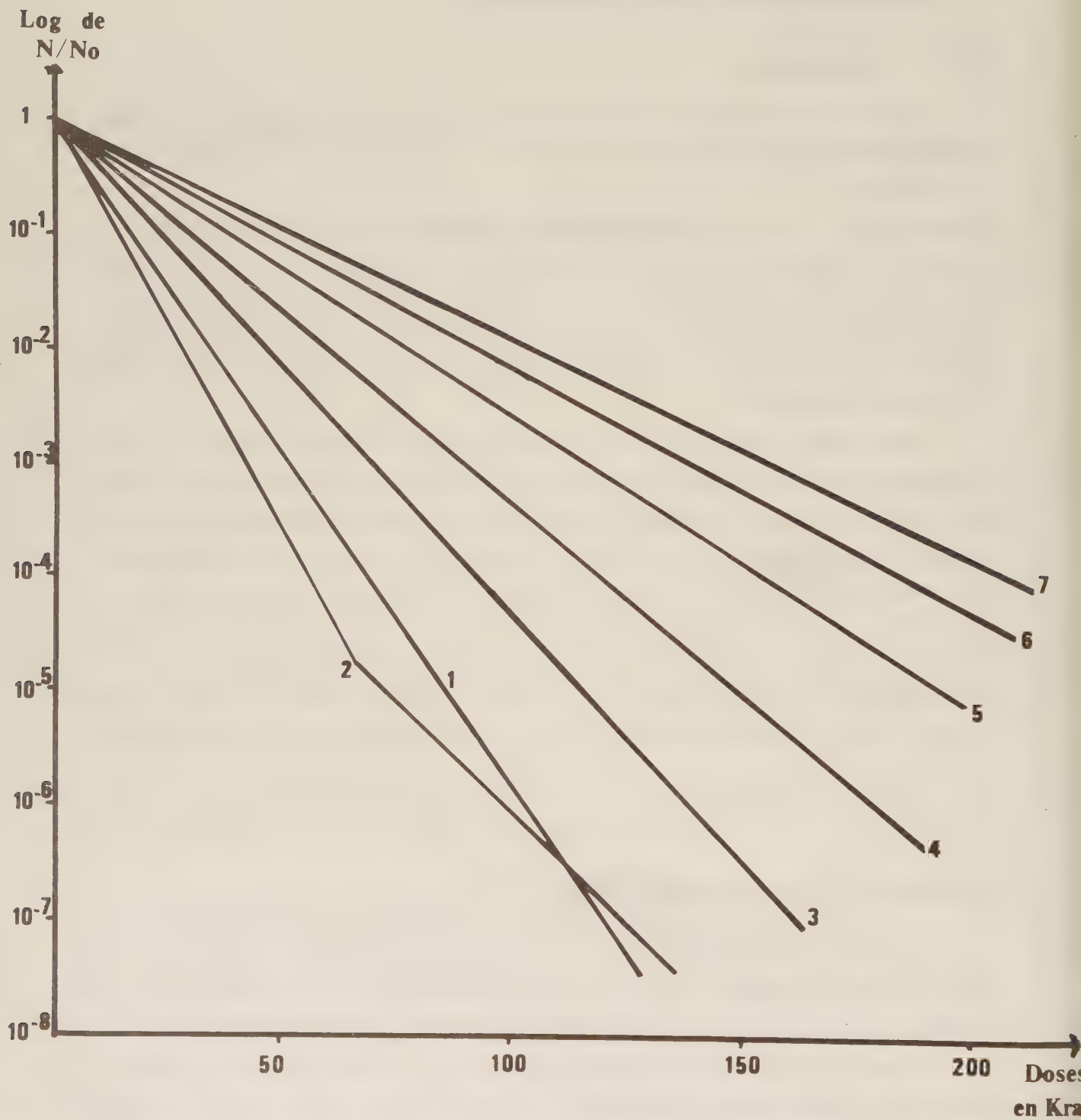
Figure 28 : Courbes d'inactivation des *Acinetobacter*1 : *A. lwoffii* IP2 : *A. calcoaceticus* 71/07/383 : *A. lwoffii* 71/07/34 et 71/07/844 : *A. calcoaceticus* IP5 : *A. calcoaceticus* 71/07/826 : *A. calcoaceticus* 71/07/357 : *A. calcoaceticus* 71/07/37

Tableau LXXXII : D10 DES ACINETOBACTER

ESPECES	SOUCHES	D10	D10 MOYENNE
Acinetobacter lwoffii	IPP 5382	23 - 14 - 13 - 13 - 23 ^a	17 ^c
	71/07/34	20 - 21 - 24 - 29 ^a	23
	71/07/84	23 - 24	23
Acinetobacter calcoaceticus	IPP 5290	35 - 30 - 23 - 32	30
	71/07/82	53 - 43 - 35	40
	71/07/35	46 - 42 - 50	46
	71/07/37	55 - 49	52
	71/07/38	12,29 ^b - 8,25 ^b - 15,32 ^b	12 - 28 ^b

a : Courbe composite, la D10 citée est calculée sur la partie de la courbe ayant la pente la plus faible.

b : Courbe composite, les deux valeurs citées correspondent aux D10 calculées à partir des deux pentes.

c : Moyenne arithmétique.

souche est même plus radiosensible que deux souches d'A. lwoffii. Par contre, les quatre autres souches d'A. calcoaceticus sont nettement plus radiorésistantes que les A. lwoffii. Nous ne savons pas pourquoi la courbe d'inactivation de la souche 71/07/38 est composite ; peut-être cela est-il dû à une hétérogénéité d'ordre physiologique ?

Relation entre antibiorésistance et radiorésistance

Si l'on se reporte au tableau LVII, page 281 , on constate que les souches sauvages d'Acinetobacter calcoaceticus sont dans l'ensemble plus résistantes aux antibiotiques que les Acinetobacter lwoffii. Cependant, dans l'espèce A. calcoaceticus, la souche la plus antibiotique (71/07/37) est celle qui s'est révélée la plus radiorésistante.

Les deux espèces d'Acinetobacter diffèrent pas leur antibiorésistance et leur radiorésistance, sans que l'on puisse dire à priori qu'il y ait une relation de cause à effet entre les deux. Mais pour une même espèce, il ne semble pas exister de relation entre la résistance aux antibiotiques et la radiorésistance.

VII.2. - Discussion des résultats

Dans le groupe des bacilles à Gram négatif, certaines espèces se distinguent par une radiorésistance élevée. C'est le cas des Alcaligenes et des Acinetobacter.

Thornley (328), lors d'une étude sur quinze souches d'Alcaligenes, a obtenu des courbes de survie sigmoïdes avec des D10 (calculées sur la partie exponentielle) allant de 10 à 60 Krads. L'auteur a trouvé, par ailleurs, qu'il existait une relation entre la radiorésistance et la sensibilité à la pénicilline, les souches résistantes à la pénicilline étant les plus radiosensibles.

Matsuyama et Coll. (231) ont déterminé les D10 d'une souche d'Alcaligenes faecalis irradiée dans différentes conditions ; en tampon phosphate et en aérobiose, la D10 était de 30 Krads.

Christensen (74) a isolé, d'échantillons de poussière, des souches d'Acinetobacter calcoaceticus (ex Bacterium anitratum) qui se sont révélées très radiorésistantes. Les courbes d'inactivation déterminées

par irradiation des souches desséchées sur des supports plastiques , étaient totalement sigmoïdes, si bien qu'il n'était pas possible de calculer la D10. Mais les doses nécessaires pour inactiver 10^8 germes étaient très élevées puisqu'elles étaient comprises entre 3 et 5 Mrads.

Nous avons étudié des souches appartenant aux deux espèces d'Acinetobacter. Ces souches, irradiées en suspension dans de l'eau distillée, sont plus radiorésistantes que les autres bacilles Gram négatif précédemment étudiés, puisque les D10 sont comprises entre 17 et 52 Krads. Par contre, nos souches semblent moins radiorésistantes que celles de Christensen, bien que la comparaison soit difficile du fait des conditions expérimentales différentes.

On estime, en général, que l'irradiation à l'état sec multiplie la radiorésistance par un facteur de 4 à 6. Pour notre souche la plus résistante, une dose d'environ 415 Krads est nécessaire pour inactiver 10^8 germes irradiée en suspension ; à l'état sec, cette dose serait donc d'environ 2,5 Mrads.

Nos résultats diffèrent, également de ceux de Christensen par la forme des courbes de survie. En effet, alors que Christensen a obtenu des courbes sigmoïdes, les nôtres sont le plus souvent linéaires et parfois composites.

Finalement, les valeurs des D10 de nos souches d'Acinetobacter se rapprochent plus de celles rapportées pour les Alcaligenes.

Notre étude a montré que les souches d'A. lwoffii qui sont, en général, les plus antibiosensibles sont également les plus radiosensibles. Par contre, dans l'espèce A. calcoaceticus, la souche la plus radiorésistante est celle qui est la plus sensible aux antibiotiques, constatation qui est voisine de celle de Thornley pour les Alcaligenes.

VIII. RADIOSENSIBILITE DES LEVURES DU GENRE CANDIDA

VIII.1. - Résultats

16 souches ont été étudiées au total. La reproductibilité des résultats a été assez bonne sauf pour quelques souches où les écarts de D10 se sont montrés importants.

Nous avons tracé, pour chaque souche, la courbe d'inactivation la plus probable, en utilisant les points de toutes les déterminations. Les courbes de survie ont été trouvées toujours linéaires ; un échantillonnage des courbes moyennes obtenues est présenté dans la figure n° 29, page 358 .

Les D10 figurent dans le tableau LXXXIII. page 359

Les 12 Candida albicans étudiées ont des D10 comprises entre 115 et 180 Krads ; la souche de collection (IPP 646) se place parmi les souches les plus sensibles. La moyenne arithmétique des D10 de ces douze souches est de 141 Krads.

Les 2 souches de Candida krusei ont des D10 de 128 et 140 Krads, leur radiosensibilité est donc identique à celles des Candida albicans.

Par contre, les Candida tropicalis apparaissent nettement plus résistantes puisque les deux souches étudiées ont des D10 de 210 Krads.

Les levures du genre Candida sont donc très radiorésistantes puisque lorsqu'elles sont irradiées en suspension leurs D10 sont toujours supérieures à 100 Krads.

Le tableau LXXXIV montre que pour avoir un facteur d'inactivation de 10^8 , la dose minima est de l'ordre de 1 Mrad ou plus. (voir page 360)

VIII.2. - Discussion des résultats

De rares travaux ont porté sur l'étude de la radiosensibilité des levures.

Ley et Coll. (214), puis Osterberg (246) ont isolé parmi la flore contaminante de matériel médicochirurgical, des souches de levure (levures qui n'appartenaient pas au genre Candida) qui se sont révélées très radiorésistantes. En effet, Ley et Coll. ont trouvé qu'une dose de 1,1 Mrad ne donnait qu'un facteur d'inactivation de 10^4 , pour leur souche. Les deux souches d'Osterberg, irradiées à l'état sec avaient des D10 de 600 à 700 Krads.

Figure 29 : Courbes d'inactivation de quelques levures

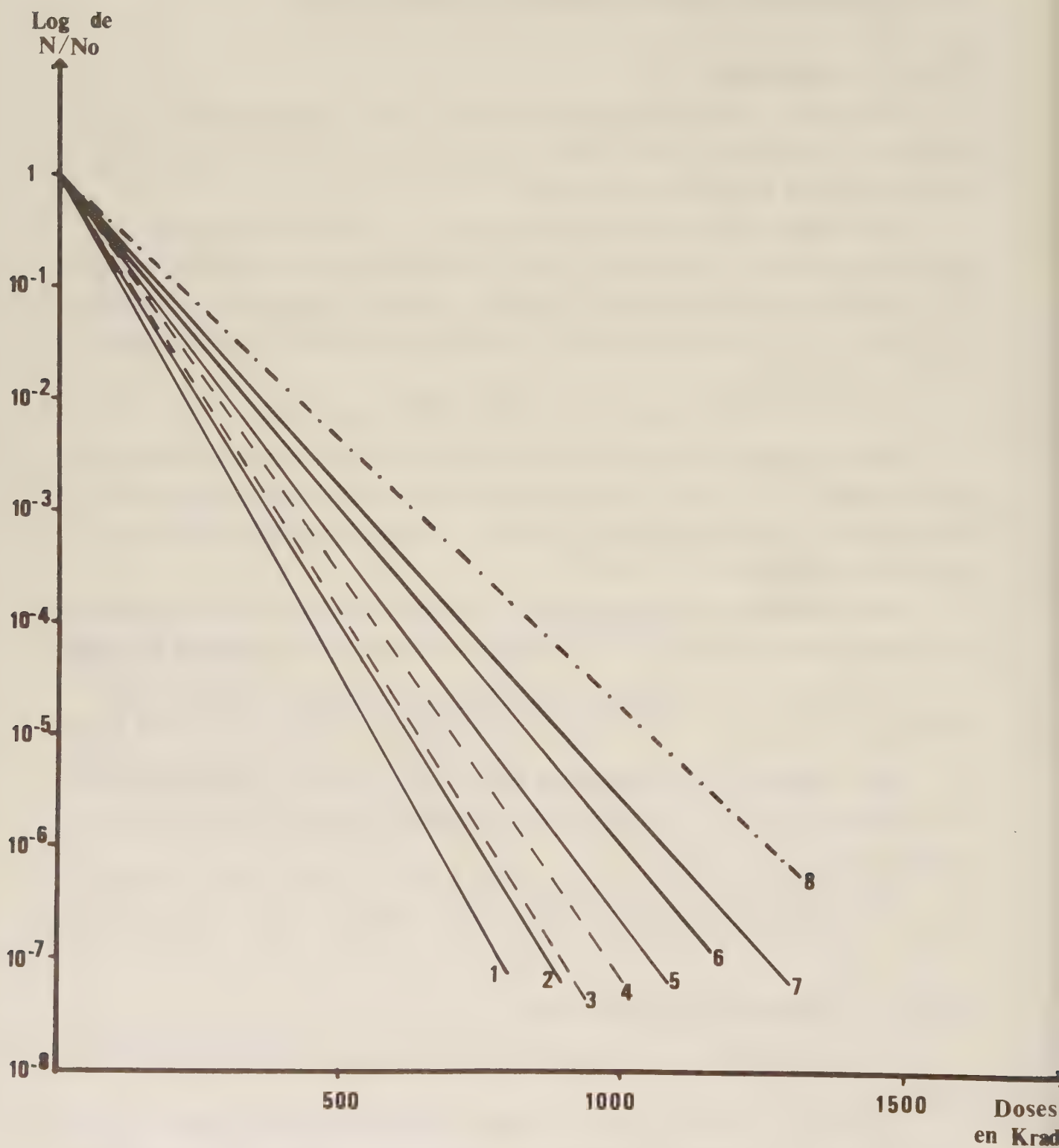
1: *C. albicans* 1425: *C. albicans* 172: *C. albicans* IPP 6466: *C. albicans* 143: *C. krusei* 1177: *C. albicans* 804: *C. krusei* 1488: *C. albicans* 25 et 35

Tableau LXXXIII : D10 EN KRADS DES LEVURES DU GENRE CANDIDA

ESPECES	SOUCHES N°	D10	D10 MOYENNE
Candida albicans	IPP 646	110 - 148 - 134 - 147	125
	142	117 - 111	115
	1	112 - 123	118
	107	100 - 102 - 144	126
	5	159 - 120 - 129 - 135	135
	172	132 - 135	135
	165	165 - 126 - 117	138
	158	140 - 150	145
	17	159 - 147 - 147	150
	82	148 - 171	156
	14	205 - 159 - 144	168
	80	210 - 156 - 183	180
Candida tropicalis	25	198 - 231 - 225	210
	35	210 - 216 - 210	210
Candida krusei	117	120 - 152 - 120	128
	148	160 - 134	140

Tableau LXXXIV : LEVURES : DOSES MINIMA NECESSAIRES POUR AVOIR UN
FACTEUR D'INACTIVATION DE 10^8

ESPECES	SOUCHES	DOSES EN Mrads
Candida albicans	IPP 646	1
	142	0,92
	1	0,95
	107	1
	5	1,08
	172	1,08
	165	1,1
	158	1,16
	17	1,2
	82	1,25
	14	1,35
	80	1,44
Candida tropicalis	25	1,68
	35	1,68
Candida krusei	117	1,02
	148	1,12

La seule étude, déjà fort ancienne, sur les levures du genre Candida est celle de Bridges et Coll. (48). Ces auteurs ont seulement déterminé la dose capable d'inactiver une suspension dont la teneur en cellules n'a pas été précisée. Cette dose était de 1 Mrad pour une souche de C. albicans, de 1,15 pour une souche de C. ~~krusei~~ et 1,9 pour une souche de C. parakrusei.

Notre étude confirme que les levures du genre Candida sont très radiorésistantes. Si l'on compare nos résultats sur les levures et les Streptocoques faecium, on constate que les levures étudiées sont plus radiorésistantes que les souches de S. faecium les plus radiorésistantes. Irradié en suspension, S. faecium A₂1, réputé pour sa haute radiorésistance a une D10 de 88 Krads.

Notre travail confirme également qu'il peut exister une différence de radiosensibilité entre les espèces de levures. Comme Bridges et Coll. (48), nous n'avons pas trouvé une grande différence entre C. albicans et C. krusei ; par contre nos deux souches de C. tropicalis sont apparues nettement plus résistantes que les précédentes.

IX. - RADIOSENSIBILITE DES SPORES DE BACILLUS PUMILUS E 601

Bacillus pumilus E 601 est un des germes tests proposé par l'Agence Internationale pour l'Energie Atomique, pour effectuer les contrôles microbiologiques d'efficacité de la radiostérilisation. La Pharmacopée française a suivi ces recommandations de l'Agence et impose un contrôle avec des "indicateurs biologiques" chargés d'environ 10^8 spores de B. pumilus.

Nous avons donc été amené à déterminer la radiosensibilité des spores de B. pumilus en suspension, puis d'indicateurs préparés à partir de ces suspensions.

IX.1. - Radiosensibilité des spores en suspension

Deux lots de spores, en suspension en eau distillée ont été préparés en vue de la fabrication des indicateurs. Chaque lot a été irradié à plusieurs reprises et la courbe d'inactivation moyenne a été tracée. La reproductibilité des résultats a été très bonne. Ces deux courbes sont présentées dans la figure n° 30 , page 363.

On constate que les deux courbes d'inactivation sont parfaitement linéaires, par contre les pentes sont différentes. En effet, ces deux suspensions ont une radiosensibilité différente puisque les D10 sont de 0,30 et 0,40 Mrad.

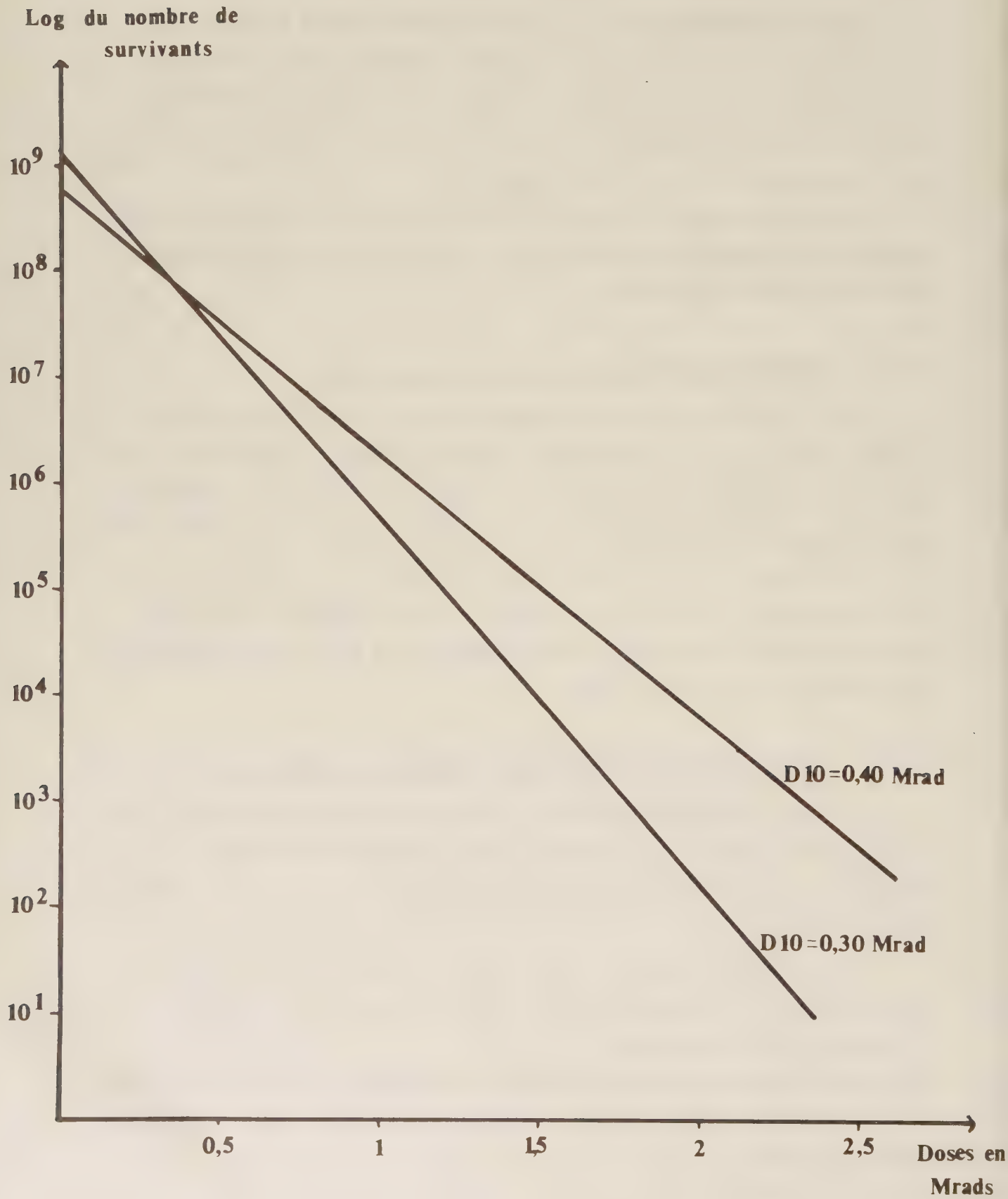
IX.2. - Radiosensibilité des spores irradiées à l'état sec

Avec les deux suspensions de spores, nous avons préparé 11 lots d'indicateurs selon la technique décrite dans le paragraphe II.1.1.4 page 286 . Les indicateurs obtenus contenaient de 2 à $5 \cdot 10^8$ spores viables, comme cela a été vérifié par numération de plusieurs indicateurs de chaque lot.

Les courbes de survie, pour chaque lot d'indicateurs, ont été déterminées en utilisant tous les points obtenus à la suite de 4 à 5 irradiations successives.

La plupart des courbes se sont révélées linéaires, sauf pour 3 lots, où les courbes d'inactivation présentaient un léger épaulement d'environ 0,1 Mrad.

Figure 30 : Courbes d'inactivation de spores de *Bacillus pumilus* E 601
irradiées en suspension



Les D10 calculées à partir de ces courbes figurent dans le tableau LXXXIV page 365.

On constate qu'elles varient de 0,30 à 0,40 Mrad ; mais pour la majorité des lots, les D10 sont comprises entre 0,31 et 0,34 Mrad. La D10 moyenne de ces 11 lots d'indicateurs est de 0,33 Mrad.

Sur la figure n° 31, nous avons tracé la courbe d'inactivation moyenne des 11 lots d'indicateurs biologiques. A titre indicatif, nous présentons également dans cette figure, une des courbes d'inactivation obtenue par le Dr Christensen* avec un de ses lots d'indicateurs de Bacillus pumilus E 601. Cette courbe est légèrement sigmoïde, l'épaulement étant semblable à ceux que nous avons observés avec certains de nos lots. La D10 des indicateurs du Dr Christensen est de 0,32 Mrad.

IX.3. - Discussion des résultats

La première observation que l'on peut faire est que les spores de B. pumilus ont la même radiosensibilité lorsqu'elles sont irradiées en suspension dans de l'eau distillée ou après dessiccation de suspension en bouillon-sérum.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Pepper et Coll. (250), Powers (267) et de Burt et Ley (62). Ces derniers ont étudié l'influence des conditions d'irradiation sur la radiosensibilité des spores de B. pumilus. La radiosensibilité ne change pas lorsque l'irradiation est effectuée en suspension dans du bouillon, du sérum, du tampon phosphate ou après dessiccation de ces différentes suspensions sur des supports variables ; par contre, les spores irradiées dans de l'alcool polyvinylique ou des corps gras sont beaucoup plus radiorésistantes.

Nous avons obtenu des D10 de 0,30 à 0,40 Mrad. Ces valeurs sont très proches de celles citées par Pepper et Coll. (250), Briggs et Yazdany (56). Elles sont, par contre, supérieures à celles de Darmady et Coll. (96), Matsuyama et Coll. (232), Borick et Fogarty (46), et

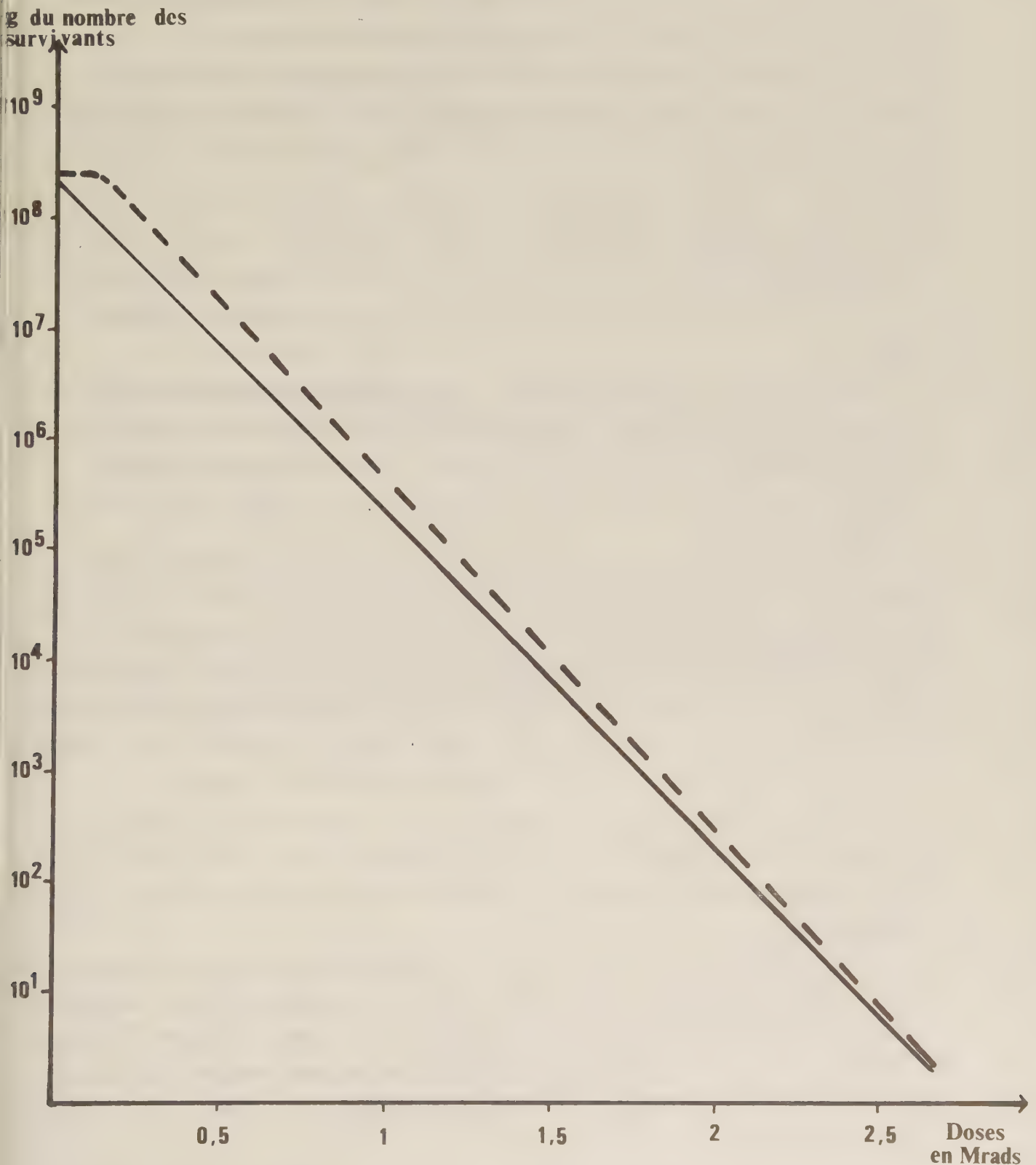
* Nous remercions le Dr Christensen qui a eu l'obligeance de nous envoyer un lot d'indicateurs de spores de B. pumilus avec la courbe de survie correspondante.

Tableau LXXXIV : D10 DES INDICATEURS DE BACILLUS PUMILUS

LOT N°	D10 en Mrads
1	0,30
2	0,33
3	0,32
4	0,34
5	0,33
6	0,31
7	0,34
8	0,31
9	0,40
10	0,33
11	0,33
Moyenne	0,33

Figure 31 : *Bacillus pumilus* E 601

Courbes d'inactivation de spores irradiées à l'état sec
(indicateurs biologiques)



-- Courbe obtenue par le Dr Christensen avec un de ses lots d'indicateurs
D 10 = 0,32 Mrad

— Courbe moyenne de nos 11 lots d'indicateurs D 10 = 0,33 Mrad

Yamazaki (357). Elles sont, également, plus élevées que celles obtenues par Burt et Ley (62) dans des conditions d'irradiation identiques aux nôtres, mais par contre voisines des D10 rapportées par ces auteurs pour des conditions de radiorésistance maxima.

Lors de leurs premiers travaux sur B. pumilus, Christensen et Holm (67) avaient obtenu pour B. pumilus des D10 d'environ 0,26 Mrad et avaient remarqué que la radiosensibilité pouvait varier d'une préparation à l'autre.

Dans un travail postérieur, Christensen et Sehested (69) ont étudié l'influence des conditions de préparation sur la radiosensibilité des échantillons desséchés ; ils ont montré, par exemple, qu'avant la dessiccation, un lavage des spores dans du tampon diminuait la résistance.

Par la suite, les indicateurs de B. pumilus E 601 préparés par l'équipe du Dr Christensen ont toujours eu une D10 supérieure à 0,30 Mrad ; notamment le lot d'indicateurs que le Dr Christensen nous a envoyé et que nous citons comme référence dans la figure n° 31, a une D10 de 0,32 Mrad.

Yamazaki, lors d'une étude sur la radiosensibilité des spores de différentes espèces de Bacillus (357) a montré que le milieu de culture utilisé pour la production des spores pouvait avoir une influence sur la radiorésistance. Pour B. pumilus E 601, la D10 est plus élevée (0,29 Mrad) lorsque les spores sont produites sur Agar nutritif additionné de 0,3 % d'extrait de levure. La D10 la plus faible (0,23 Mrad) est obtenue lorsque la production est faite sur gélose nutritive simple.

Tous ces travaux montrent bien que les conditions de préparation des spores et la nature du milieu de suspension avant dessiccation peuvent, éventuellement, modifier la radiosensibilité des spores de Bacillus pumilus.

Les contrôles d'efficacité de la radiostérilisation, à l'aide d'indicateurs biologiques doivent être fiables et reproductibles. Les indicateurs doivent donc avoir une radiosensibilité peu différente d'un lot à l'autre, et en tout cas, parfaitement connue pour chaque lot. Il est donc nécessaire de préparer ces indicateurs dans des conditions standardisées au maximum.

Nos indicateurs ont été préparés selon les techniques mises au point par le Dr Christensen qui possède une expérience de plus de 10 ans en la matière.

Les courbes d'inactivation de ces indicateurs sont très proches de celles de Christensen. De petites variations de radiosensibilité entre les différents lots sont cependant inévitables. Chaque lot doit donc être parfaitement étalonné ; la courbe d'inactivation doit être déterminée à plusieurs reprises ; la marge de variation du nombre de survivants à chaque dose, compatible avec la précision de la technique, doit être également calculée. Lorsque ces différents paramètres sont connus, les indicateurs biologiques permettent d'effectuer un contrôle précis.

La Pharmacopée française préconise d'utiliser les indicateurs de Bacillus pumilus E 601 pour faire un contrôle "du tout ou rien" lorsque la dose stérilisante appliquée est de 2,5 Mrads, c'est à dire que les indicateurs irradiés à 2,5 Mrads ne doivent contenir aucun survivant.

Nos indicateurs ne permettent pas de faire un tel contrôle, car étant chargés avec plus de 10^8 spores, après irradiation à 2,5 Mrads, il reste encore de l'ordre de 10^1 spores survivantes.

En fait, nous avons pensé qu'il était préférable de les préparer de cette façon, car cela permet de calculer avec précision le facteur d'inactivation obtenu.

CONCLUSIONS

La première partie de ce travail a consisté en une revue approfondie de la littérature sur la radiostérilisation.

Dans cette étude bibliographique, il est fait une large place à la sensibilité aux rayonnements ionisants des principales espèces microbiennes, mais la plupart des travaux ont été effectués sur des souches de collection ou des souches appartenant à la flore de contamination tellurique.

C'est pourquoi, notre travail personnel a eu pour but de déterminer la sensibilité aux rayonnements gamma de souches microbiennes d'origine humaine et en particulier isolées en milieu hospitalier, en vue de l'application de la radiostérilisation au matériel médico-chirurgical à usage multiple et aux tissus biologiques.

Au total ont été soumises à cette étude, 8 souches de collection et 131 souches "hospitalières" se répartissant comme suit :

- 34 Staphylococcus aureus
- 14 Staphylococcus epidermidis
- 10 Streptococcus faecalis
- 2 Streptococcus durans
- 15 Streptococcus faecium
- 22 Escherichia coli dont 13 entéropathogènes
- 13 Pseudomonas aeruginosa
- 6 Acinetobacter
- 15 levures du genre Candida

Ces souches ont été choisies parmi des espèces responsables de contaminations intra-hospitalières, ou particulièrement radiorésistantes, ou rencontrées fréquemment dans la flore de contamination du matériel médico-chirurgical.

Une étude détaillée des caractères biochimiques, antigéniques et de la résistance aux antibiotiques de ces souches a été entreprise afin de mettre en évidence d'éventuelles relations entre d'une part la radiorésistance et d'autre part le biotype, le sérotype et l'antibiotype.

La sensibilité aux rayonnements gamma a été évaluée en déterminant pour chaque souche la courbe d'inactivation doses-survivants. A partir de ces courbes, la D10 ou dose qui diminue la population microbienne d'un facteur 10, a été calculée. La détermination de la sensibilité a été faite sur des suspensions microbiennes en eau distillée.

De l'ensemble des résultats, il ressort que :

- les souches hospitalières ne semblent pas plus radiorésistantes que les souches de collection étudiées parallèlement, sauf quelques rares exceptions.

Les valeurs des D10 obtenues sont comparables à celles qui ont été colligées dans la littérature.

- des espèces comme S. aureus et P. aeruginosa ont une radiosensibilité relativement homogène. D'autres, telles que S. faecalis, S. faecium, Acinetobacter et Candida albicans présentent des différences importantes selon les souches. Dans ce cas et pour les souches bactériennes, il ne semble pas exister de relation entre les niveaux de radiorésistance et le biotype ou le sérotype ou l'antibiotype.

L'examen des radiorésistances par espèce a montré que :

. Les souches de Staphylococcus epidermidis dont la radiosensibilité exacte était mal connue sont plus radiorésistantes que celles de Staphylococcus aureus.

En effet, lorsque l'irradiation est faite en eau distillée, les D10 moyennes sont respectivement de 22,7 et 15,2 Krads.

A l'état sec, les D10 de 4 souches de Staphylococcus epidermidis étaient comprises entre 125 et 180 Krads, celles de 4 staphylococcus aureus entre 75 et 135 Krads. Ces résultats démontrent que l'irradiation à l'état sec augmente considérablement la radiorésistance puisqu'il y a multiplication de la D10 par un facteur de 4 à 7.

Par ailleurs, il est apparu que la forme des courbes d'inactivation diffère selon les espèces de Staphylocoques. En effet, les courbes sont linéaires pour les souches de Staphylococcus aureus et sigmoïdes pour les souches de Staphylococcus epidermidis.

. les souches de Streptococcus faecalis ont des D10 variant de 14 à 50 Krads.

. certaines souches de Streptococcus faecium ont une radiosensibilité comparable à celle de Streptococcus faecalis ; cependant 5 souches de Streptococcus faecium sont nettement plus radiorésistantes avec des D10 allant de 56 à 118 Krads. Deux d'entre elles ont même des D10 supérieures à celles de la souche A₂¹, pourtant connue pour sa grande radiorésistance.

En effet, les D10 sont de 88 Krads pour Streptococcus faecium A₂¹ et de 100 et 118 Krads pour les deux autres souches.

. la plupart des souches d'E. coli entéropathogènes ont une radiosensibilité plus faible que celle des E. coli non entéropathogènes.

. il a été rapporté que certaines souches d'Acinetobacter présentent une résistance élevée aux rayonnements ionisants. Nos souches ont effectivement été trouvées plus radiorésistantes que celles des autres espèces de bacilles à Gram négatif, particulièrement Acinetobacter calcoaceticus.

. toutes les souches de levures étudiées ont été trouvées très radiorésistantes puisque les D10 sont comprises entre 115 et 210 Krads, valeurs qui sont proches des D10 des spores bactériennes. Cette notion est assez nouvelle puisque la radiosensibilité des levures a été peu étudiée jusqu'alors.

. enfin, nous avons préparé des indicateurs microbiologiques de spores de Bacillus pumilus E 601. Les courbes d'inactivation se sont révélées tout à fait similaires à celles d'indicateurs préparés dans le laboratoire international de référence du Dr. Christensen (Copenhague).

Ces indicateurs sont faciles à préparer et donnent des résultats reproductibles ; ils permettent d'effectuer des contrôles fiables de l'efficacité microbiologique de la radiostérilisation.

C O N C L U S I O N S

...

L'ensemble de nos résultats montre qu'il existe des différences importantes de radiosensibilité entre les espèces testées et parfois entre les souches d'une même espèce.

Dans nos conditions expérimentales, les souches ont une D10 qui ne dépasse pas 210 Krads.

Si la stérilisation du matériel est effectuée en milieu aqueux, il semble qu'une dose d'irradiation de 1,5 à 2 Mrads permette d'obtenir une marge de sécurité suffisante même si la flore contaminante est composée d'espèces résistantes comme Streptococcus faecium ou levures du genre Candida.

Par contre, pour du matériel médico-chirurgical généralement stérilisé à sec, les doses doivent être plus importantes ; en effet, nos expériences nous montrent que dans ce cas, la D10 est multipliée par un facteur de 4 à 7.

La dose stérilisante recommandée par la plupart des Pharmacopées pour le matériel médico-chirurgical à usage unique est de 2,5 Mrads ; cette dose est suffisante pour inactiver la plupart des espèces testées. Cependant, si la flore de contamination est riche en Acinetobacter calcoaceticus, Streptococcus faecium et en levures, une dose supérieure peut être nécessaire.

VU, LE DIRECTEUR DE L'U.E.R.
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES,

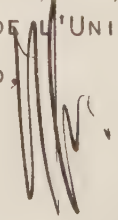


LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE :



VU ET PERMIS D'IMPRIMER
LYON, LE 9/10/77

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ
CLAUDE BERNARD,



SOUTENUE LE 4 novembre 1977

DACTYLOGRAPHIÉE

SOUS LA PRÉSIDENCE DE M. LE PROFESSEUR .CARRAZ.....

TITRE DE LA THESE : LA STÉRILISATION PAR LES RAYONNEMENTS IONISANTS

Détermination de la sensibilité aux rayons γ de 130 souches microbiennes d'origine hospitalière.

RESUME

Dans un premier temps ce travail a comporté une large étude bibliographique sur la stérilisation par les rayonnements ionisants.

Dans un second temps, le travail personnel a eu pour but - en vue de l'application de la radiostérilisation au matériel chirurgical à usage multiple et aux tissus biologiques - de déterminer la sensibilité aux rayons gamma de huit souches de collection et 131 souches d'origine hospitalière appartenant aux espèces suivantes : Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus faecalis, Streptococcus durans, Streptococcus faecium, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter lwoffii, Acinetobacter calcoaceticus, Bacillus pumilus, Bacillus sphaericus et levures du genre Candida.

Les caractères biochimiques, antigéniques, la résistance aux antibiotiques de ces différentes souches ont également été étudiés afin de voir s'il pouvait exister une relation entre eux et le niveau de résistance au rayonnement gamma. Les résultats ont montré qu'il y avait de grandes différences de radiorésistance entre les espèces et également dans certains cas, au sein d'une même espèce.

Il a été confirmé, d'autre part, que certaines conditions d'irradiation, en particulier l'irradiation à l'état sec, augmentaient fortement la radiorésistance des souches (Staphylococcus aureus et epidermidis entre autres).

Il est apparu que les souches hospitalières étudiées ont la même sensibilité que les souches de collection, sauf quelques rares exceptions. Ainsi deux de nos souches de Streptococcus faecium se sont montrées plus radiorésistantes que la souche de S. faecium A₂1 (une des souches microbiennes les plus résistantes) lorsque l'irradiation est effectuée en eau distillée.

.../...

VU, À LYON, LE 9/10/77

LE PRÉSIDENT DE THÈSE :

Enfin, nous avons noté que toutes les souches de levures étudiées avaient une radiorésistance élevée se rapprochant de celle des bactéries sporulées ; ce fait était jusqu'alors peu connu.

Ce travail permet de tirer quelques conclusions générales sur les doses stérilisantes à appliquer en fonction du type de matériel traité.

A handwritten signature or mark, possibly a stylized 'S' or 'L', followed by a vertical line.

- 1 - ACHEY P.M., BILLEN, 1968
Correlation of alteration in chromosome replication sequence with cell lethality
Rad. Res., 33, 533-539
- 2 - ADLER H.I., HARDIGREE A.A., 1965
Post irradiation growth, division and recovery in bacteria
Rad. Res., 25, 92-102
- 3 - ADLER H.I., 1966
Advance in Rad. Biol., 2, 167-191
- 4 - AHN T.H., NISHIHARA H., CARPENTER C.M., TAPLIN G.V., 1964
Viability and metabolism of Staphylococcus aureus after freezing, lyophilization and irradiation.
J. Bacteriol., 88, 545-552
- 5 - ALEXANDER P., HAMILTON L.D.G., 1959
Nature, 184, 226
- 6 - ALEXANDER P., HAMILTON L.D.G., 1960
Rad. Res., 13, 214
- 7 - ALEXANDER P., LETT J.T., DEAN C.J., 1965
Progr. Biochem. Pharmacol., 1, 22
- 8 - ALEXANDER P., DEAN C.J., LETT J.T., 1967
Proceeding of conference on recovery of the irradiated cell by nucleic acids
Herceg Novi.
- 9 - ALPER T., HOWARD-FLANDERS P., 1956
Role of oxygen in modifying the radiosensitivity of E. coli B
Nature, Lond., 178, 979
- 10 - ALPER T., 1956
The modification of damage caused by primary ionisation of biological targets
Rad. Res., 5, 573

- 28 - AVERBECK D. et EBERT M., 1973
Diploidy and repair of radiation damage in *saccharomyces* mutants.
Mut. Res., 19, 305-312
- 29 - BABINI A., GUBETTA P., 1966
Inattivazione a mezzo raggi gamma di alcuni germi.
Ig. Mod., 59, 530-534
- 30 - BACQ Z.M., ALEXANDER P., 1961
- 30a - Interaction of ionizing radiation with matter p. 6-39
- 30b - General radiation chemistry, p. 100-121
- 30c - Radiation chemistry of aqueous systems, p. 122-156
- 30d - Effects of radiation on macromolecules, p. 157-213
- 30e - The effect of oxygen in radiobiology, p. 280-298
In Fundamentals of radiobiology, 2nd Ed., Pergamon Press.
- 30 bis - BAIRD PARKER A.C., 1963
A classification of Micrococci and of Staphylococci based on physiological and biochemical tests.
J. Gen. Microb., 30, 409-427
- 31 - BARNES J.H., ASHWOOD-SMITH M.J., BRIDGES B.A., 1969
Radiosensitization of bacterial cells by carbonyl compounds.
Int. J. Radiat. Biol., 15, 285-288
- 32 - BARTHA T., MERO E., SZITA J., 1969
Bacteriological model experiments on radiosterilization of catgut.
Acta Microb. Acad. Sci. Hung., 16, 31-37
- 33 - BARTLETT W.T., O'DONOVAN G.A., RICHARD D.N., 1970
Effect of gamma radiation on Serratia marcescens. Studies on the radio-sensitivity of prodigiosin production.
Rad. Res., 43, 196-203
- 34 - BATTACHARJEE S.B., 1961
Action of X irradiation on irradiation on E. coli.
Rad. Res., 14, 50-55
- 35 - BELLAMY W.D., LAWTON E.J., 1954
Problems in using high voltage electron for sterilization.
Nucleonic, 12, (4), 54-57

- 36 - BELLAMY W.D., 1955
Radiations effects on some isolated constituents.
Symposium on radiations effects on cells and bacteria.
Bact. Reviews, 19, 23-26
- 36 - BELOIAN A.B., STUART L.S., 1968
bis Methods of testing for sterility and efficacy of sterilizers, sporicides and sterilizing processes. p. 114
In Desinfection, Sterilization and Preservation. Lawrence et Block, Lea et Febiger. Philadelphia.
- 37 - BENAZET F., GODARD C., 1972
Problèmes bactériologiques posés par la radiostérilisation des appareils médico-chirurgicaux en matière plastique et par son contrôle.
Bulletin d'Information de l'Association Technique pour l'Energie Nucléaire (A.T.E.N.), (93), 18-28
- 38 - BERRY R.J., HOLM N.W., 1970
Manual on radiation dosimetry
Ed. Holm and Berry. Dekker Inc, New York.
- 39 - BILLEN D., STAPLETON G.E., HOLLAENDER A., 1953
The effect of X radiation on the respiration of Escherichia coli.
J. Bact., 65, 131
- 40 - BILLEN D., HEWITT R., JORGENSEN G., 1965
X rays induced perturbations in the replication of the bacterial chromosome.
Biochem. Biophys. Acta, 103, 440-454
- 41 - BLACKBURN R., IDDON B., MOORE J.S., PHILLIPS G.O., POWER D.M., WOODWARD T.W., 1974
Radiation sterilization of pharmaceuticals and biomedical products, p. 351
I.A.E.A., ref. (186)
- 42 - BONET-MAURY P., OLIVER H.R., GALLUT J., LEPINE P., MOLLARET H., SERVANT P., 1967
Preparation et essai de radiovaccins, p. 209-218
I.A.E.A., ref. (178)
- 43 - BONET-MAURY P., 1969
La radiostérilisation dans l'industrie pharmaceutique.
Supplément au Bulletin d'information A.T.E.N. n° 78 (juillet-août) 7-15
- 44 - BOLT O., CARROLL G., 1963
Radiation effects on organics materials.
Academic Press, New-York- London.

- 45 - BOPP C.D., SISMAN O., 1955
Radiation stability.
Nucleonics, 13, 28
- 46 - BORICK P.M., FOGARTY M.G., 1967
Effects of continuous and interrupted radiation on microorganisms.
Appl. Microb., 15, 785-790
- 47 - BOYCE R.P., HOWARD-FLANDERS P., 1964
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 57, 293-300
- 48 - BRIDGES A.E., OLIVO J.P., CHANDLER V.L., 1956
Relative resistance of microorganisms to cathode rays.
II. Yeasts and molds.
Appl. Microb., 4, 147-149
- 49 - BRIDGES B.A., HORNE T., 1959
The influence of environmental factors on the microbicidal effects of
ionising radiations.
J. Appl. Bact., 22, (1), 96-115
- 50 - BRIDGES B.A., 1961
The effect of N-ethylmaleimide on the radiation sensitivity of Bacteria.
J. Gen. Microb., 26, 467-472
- 51 - BRIDGES B.A., 1962
The chemical sensitization of Pseudomonas species to ionizing radiation.
Rad. Res., 16, 232-242
- 52 - BRIDGES B.A., 1962
The chemical protection of Pseudomonas species against ionizing radiation.
Rad. Res., 17, 801-808
- 53 - BRIDGES B.A., 1964
Microbiological aspects of radiation sterilization.
Prog. Indust. Microb., 2, 283-326
- 54 - BRIDGES B.A., 1964
Microbiological aspects of radiation sterilization.
In Progress in Industrial microbiology ; Hockenbull D.J. Ed., p. 286

- 55 - BRIGGS A., 1966
The resistance of spores of the genus *Bacillus* to phenol heat and radiation.
J. Appl. Bact., 29, (3), 490-504
- 56 - BRIGGS A., YAZDANY S., 1970
Effect of sodium chloride on the heat and radiation resistance and on the recovery of heated or irradiated spores of the genus *Bacillus*.
J. Appl. Bact., 33, 621-632
- 57 - BRUCE A.K., 1964
Extraction of the radioresistant factor of *Micrococcus radiodurans*.
Rad. Res., 22, 155-164
- 58 - BRUCE A.K., MALCHMAN W.H., 1965
Radiation sensitization of *Micrococcus radiodurans*, *Sarcina lutea*, *Escherichia coli* by p Hydroxymercuribenzoate.
Rad. Res., 24, 473-481
- 59 - BRUSTAD T., 1967
Inactivation at various temperatures of the esterase activity of trypsin by radiation of different LET.
Rad. Res. Suppl., 7, 74-86
- 60 - BRUSTAD T., 1972
Radiosensitization of anoxic cells of *E. coli* K 12 by organic nitroxyl free radicals.
Int. J. Radiat. Biol., 22, 443-456
- 61 - BURING K., 1970
Ionizing radiation for sterilization of bone. p. 71
I.A.E.A., ref. (182)
- 62 - BURT M.M., LEY F.J., 1963
Studies on the dose requirement for the radiation sterilization of medical equipment. I. Influence of suspending media.
J. Appl. Bact., 26, 484-489
- 63 - CAMPBELL J.B., BASSETT C.A.L., LUZIO J., 1970
Frozen irradiated peripheral nerve and calvarial homografts in clinical surgery, p. 59
I.A.E.A., ref. (182)

- 64 - CAMPBELL J.B., WRIGHT K.A., 1973
The use of electron sterilization with particular reference to bone and nerves, p. 257
I.A.E.A., ref. (184)
- 65 - CASTANY R., PUEL P., ENJALBERT A., 1970
Les greffes valvulaires aortiques. Conservation au froid et stérilisation par irradiation cathodique à haut voltage.
Ann. Chir. Thorac. Cardio. Vasc., 2, 379-385
- 66 - CHOU T.W., SING B., SALUNKHE D.K., CAMPBELL W.F., 1970
Effects of gamma radiation on penicillium expansum. I. Some factors influencing the sensitivity of the fungus.
Rad. Botany, 10, 511-516
- 67 - CHRISTENSEN E.A., HOLM N., 1964
Inactivation of dried bacteria and bacterial spores by means of ionizing radiation.
Acta Path. Microbiol. Scand., 60, 253-264
- 68 - CHRISTENSEN E.A., 1964
Radiation resistance of enterococci dried in air.
Acta Path. Microbiol. Scand., 61, 483-386
- 69 - CHRISTENSEN E.A., SEHESTED K., 1964
Radiation resistance of dried bacteria and bacterial spores by means of ionizing radiation.
Acta Path. Microbiol. Scand., 62, 448-458
- 70 - CHRISTENSEN E.A., HOLM N.W., JUUL F., 1967
The basis of the Danish choice of dose for radiation sterilization of disposable equipment.
In Radiosterilization of medical products, pharmaceuticals and bioproducts..
I.A.E.A., Technical Report Series, (72), 60-70
- 71 - CHRISTENSEN E.A., 1967
Radiosterilization of medical devices and supplies. p. 263-283
I.A.E.A., Vienna, ref. (178)

- 72 - CHRISTENSEN E.A., MUKHERJI S., HOLM N.W., 1968

Microbiological control of radiation sterilization of medical supplies.
I. Total count on medical products (Disposable syringes and Donor sets)
Prior to radiation sterilization.

Risø Report n° 122

- 73 - CHRISTENSEN E.A., EMBORG C., HOLM N.W., 1969

Microbiological control of radiation sterilization of medical supplies.
II. Number of microorganisms on medical products prior to sterilization
as a function of the storage time between production and microbiological
control.

Risø Report n° 194

- 74 - CHRISTENSEN E.A., 1970

Radiation resistance of bacteria and the microbiological control of
irradiated medical products. p. 1-14

I.A.E.A., ref. (182)

- 75 - CHRISTENSEN E.A., 1970

Microbiological aspects of sterilization.

Presented at the U.S.P. open Conference on biological indicators.
Arlington, August 5.

- 76 - CHRISTENSEN E.A., 1973

Hygienic requirements, sterility criteria, and quality and sterility
control. p. 131

I.A.E.A., ref. (184)

- 77 - CHRISTENSEN E.A., 1974

Radiation-induced mutants with increased resistance against ionizing
radiation. p. 29-35

I.A.E.A., ref. (185)

- 78 - CHRISTENSEN E.A., 1974

The selection of test strains and the choice of methods for preparation
of biological monitors for control on radiation sterilization, p. 67-87

I.A.E.A., ref. (185)

- 79 - COGGLE J.E., 1971

79a - Some properties of ionizing radiation, p. 1-21

79b - Effect of radiation at the molecular and subcellular levels, p. 22-34

In Biological effects of radiation : Wykeham publications (London)

- 80 - COLEBY B., INGRAM F., SHEPERD H.J., 1960
Traitement of meats with ionizing radiations. III. Radiation pasteurisation of whole eviscerated chicken carcasses.
J. Sci. Food Agric., 11, 61-71
- 81 - COLOVOS G.C., CHURCHILL B.W., 1957
The electron sterilization of certain pharmaceutical preparations.
J. Am. Pharm. Assoc., 46, 580-583
- 82 - COMTET J.J., DELIRY P., FAURE A., TOMMASI, MALLET-GUY Y., TRANSY M.J., 1972
Etude comparative de deux séries de greffes de nerfs conservés chez le chien.
Lyon Chirurgical, 68, 352-356
- 83 - CONTROULIS J., LAWRENCE C.A., BROWNELL L.E., 1954
The effect of gamma radiation on some pharmaceutical products.
J. Am. Pharm. Assoc., 43, 65-69
- 84 - COOK A.M., ROBERTS T.A., 1964
Gamma irradiation of spores of Bacillus subtilis.
J. Pharm. Pharmacol., 16, 529-532
- 85 - COOK A.M., WIDDOWSON J.P., 1967
Factors affecting the recovery of gamma irradiated Escherichia coli.
J. Appl. Bact., 30, 208-218
- 86 - COOK A.M., BERRY R.J., 1967
Pre-sterilization bacterial contamination on disposable hypodermic syringes : necessary information for the rational choice of dose for radiation sterilization. p. 295
I.A.E.A., ref. (178)
- 87 - CORNUET R., EYMERY R., 1972
Le développement de la radiostérilisation dans le monde.
Bulletin d'information A.T.E.N., (93), 12-15
- 88 - CORRY J.E.L., ROBERTS T.A., 1970
A note on the developpement of resistance to heat and gamma radiation in Salmonella.
J. Appl. Bact., 33, 733-737

- 89 - CRAMP W.A., 1969

Radiation protection of Shigella flexneri Y6R by ethanol, β mercapto-ethanol and several polyhydric alcohols.

Int. J. Radiat. Biol., 15, (3), 227-232

- 90 - CRAMP W.A., 1970

Radiosensitization of Shigella flexneri and Escherichia coli by methylhydrazine, indone trione and acriflavine.

Int. J. Radiat. Biol., 17, (6), 559-567

- 91 - CRAMP W.A., WATKINS D.K., COLLINS J., 1972

The synthesis of DNA by membrane-DNA complexes from E.coli B/r and BS-1 after exposure to fast electrons and neutrons : the measurement of oxygen-enhancement ratio and RBE value.

Int. J. Radiat. Biol., 22, (4), 379-387

- 92 - CRAMP W.A., FRAVAL N.A., COLLINS J., 1973

The effect of radiation sensitizing and protective agents on the post irradiation synthesis of DNA by membrane complexes of E. coli B/r.

Int. J. Radiat. Biol., 24, 161-168

- 93 - CRAWFORD C.G., 1973

Legal aspects of radiation sterilization. p. 153

I.A.E.A., ref. (184)

- 94 - DAINTON F.S., 1959

Chemical effects of radiation.

Proceeding of the International Congress of Radiation research - Burlington 1958

Rad. Res., Sup. 1, 1-12

- 95 - DALE W., 1942

Biochem. J., 36-80

- 96 - DARMADY E.M., HUGHES K.E.A., BURT M.M., FREEMAN B.M., POWELL D.B., 1961

Radiation sterilization.

J. Clin. Path., 14, 53-58

- 97 - DAVIS N.S., SILVERMAN G.V., MASUROVSKY E.B., 1963

Radiation-resistant, pigmented coccus isolated from Haddock tissue.

J. Bact., 86, 294-298

- 98 - DEAN C.J., 1962
Sensitization of radioresistant bacteria to x rays by iodoacetamide.
Nature, London, 196, 1324-1326
- 99 - DEAN C.J., FELDSCHREIBER P., LETT J.T., 1966
The repair of x ray damage to the desoxyribonucleic acid in Micrococcus radiodurans : a study of the excision process.
Proc. Roy. Soc. Biol., 167, 184-201
- 100 - DEARY P.P., 1970
Resistance of Bacillus subtilis spores to inactivation by γ irradiation and heating in the presence of a bactericide.
I. Suitability of viable counts procedures.
Appl. Microb., 20, (3), 455-460
- 101 - DE FLORA S., BADOLATI G., 1973
Inactivation of A₂ Hong-Kong influenza virus by heat and by freeze thawing. Comparaison of untraited and gamma irradiation preparation.
Boll. Ist. Sieroter. Milanese, 52, (4), 293-305
- 102 - DENNY C.B., BOHRER C.W., PERKINS W.E., TOWNSEND C.T., 1958
Food. Res., 24, 44-50
- 103 - DESROSIER N.W., 1960
Radiation technology in food, agriculture and biology.
Avi publishing company, Wesport.
- 104 - DEWEY D.L., 1960
Effect of glycerine on the X ray sensitivity of Serratia marcescens.
Nature, 187, 1008-1010
- 105 - DEWEY D.L., 1963
The effect of protectors on Serratia marcescens during anaerobic X irradiation.
Int. J. Radiat. Biol., 1, 151-154
- 106 - DEXTER F., 1973
A review of preparing tissue grafts for surgical use with special references to gamma radiation. p. 245
I.A.E.A., ref. (184)

- 107 - DHARKAR S.D., 1964
Sensitization of microorganisms to radiation by previous ultrasonic treatment.
J. Food Science, 29, 641-643
- 108 - DICK G.W., SCHWERDT C.F., HUBER W., SCHARPLESS G.R., HOWE H.A., 1951
Immunization of cotton rats with inactivated lansing poliomyelitis virus.
Amer. J. of Hyg., 53, 131-138
- 109 - DONNELLAN J.E., STAFFORD R.S., 1968
The ultraviolet photochemistry and photobiology of vegetative cells and spores of Bacillus megaterium.
Biophys. J., 8, 17
- 110 - DRAKE M.P., GIFFEE J.W., JOHNSON D.A., KOENIG V.L., 1957
J. Ann. Chem. Soc., 79, 1395
- 111 - DRIEDGER A.A., JAMES A.P., GRAYSTON M.J., 1970
Cell survival and X rays-induced DNA degradation in Micrococcus radio-
durans.
Rad. Res., 44, 835-845
- 112 - DRIEDGER A.A., GRAYSTON M.J., 1970
The enhancement of X rays-induced DNA degradation in Micrococcus radio-
durans by phenethyl alcohol.
Can. J. Microb., 17, 487-493
- 113 - DUCOLOMB R., CADET J., TEOULE R., 1971
Effet des rayons X sur l'uracile et l'acide uridylique en solution aqueuse aérée.
C.R. Acad. Sci. Paris, 273, 2647-2649
- 114 - DUCOLOMB R., CADET J., TEOULE R., 1974
Irradiation γ de l'acide uridylique. Rupture de la liaison N glycosidique.
Int. J. Radiat. Biol., 25, 139-149
- 115 - DUGGAN D.E., ANDERSON A.W., ELLIKER P.R., CAIN R.F., 1959
Ultraviolet exposure studies on a gamma radiation resistant micrococcus isolated from food.
Food Res., 24, 376-382

- 116 - DUPUY P., TREMEAU O., 1961
Int. J. App. Radiat. Isotopes 11, 145
- 117 - DYER J.K., ANDERSON A.W., DUTTIYABODHI P., 1966
Radiation survival of food pathogens in complex media
Appl. Microb., 14, (1), 92-97
- 118 - EKERT B., PATTEIN A., 1970
Effets des rayons gamma sur les ribosomes d'E. coli.
Int. J. Radiat. Biol., 17, (1), 47-59
- 119 - EKERT B., LATARJET M.F., 1971
Inactivation par les rayons γ des propriétés fonctionnelles des RNA de transfert d'E. coli (phenylalanine et lysine).
Int. J. Radiat. Biol., 20, (6), 521-540
- 120 - EMBORG C., 1973
Equipment for preservation of blood and blood transfusion, p. 191
I.A.E.A., ref. (184)
- 121 - EMBORG C., ERIKSEN W.H., 1974
Radiation induced radiation resistance in M. radiodurans strains R₁.
p. 37
I.A.E.A., ref. (185)
- 122 - EMBORG C., CHRISTENSEN E.A., KALLINGS L.O., 1974
Control of the microbiological efficiency of radiation sterilization plants by means of B. sphaericus strain C1A, Streptococcus faecium, strain A₂₁ and coli phage T1. p. 53
I.A.E.A., ref. (185)
- 123 - EMBORG C., ERIKSEN W.H., 1974
Radiation inactivation of dried preparation with spores of various Bacillus strains and their possible use in control of radiation of radiation sterilization procedures. p. 89
I.A.E.A., ref. (185)
- 124 - ERDMAN E., THATCHER F.S., MAC QUEEN K.F., 1961
Studies on the irradiation of microorganisms in relation to food preservation. I. Comparative sensitivities of specific bacteria of public health significance.
Can. J. Microbiol., 7, 199-205

- 125 - ERDMAN E., THATCHER F.S., MAC QUEEN K.F., 1961
Studies on the irradiation of microorganisms in relation to food preservation. II. Irradiation resistant mutants.
Can. J. Microbiol., 7, 207-215
- 126 - FEHER I., PELLET S., UNGER E., PETRANYI G., 1974
Study of the organization and immunological qualities of lyophilised and radio-sterilized extrasynovial dog tendon preparations.
I.A.E.A., ref (186)
- 127 - FLEURETTE J., TRANSY M.J., MIKAELOFF P., 1972
Stérilisation de valves cardiaques humaines par rayonnement gamma.
Bulletin A.T.E.N., 23, 70-77
- 127 bis - voir ci-dessous.
- 128 - FLEURETTE J., TRANSY M.J., MIKAELOFF P., 1974
Stérilisation de valves cardiaques humaines par rayonnement gamma.
I.A.E.A., ref. (185)
- 129 - FOX M., HOPKINS J., 1970
Post irradiation DNA degradation and response to fractionated doses in Micrococcus radiodurans.
Int. J. Radiat. Biol., 18, 507-519
- 130 - FREEDMAN M.L., BRUCE A.K., 1971
The relationship of radioresistance to balanced growth-rate in Micrococcus radiodurans.
Int. J. Radiat. Biol., 19, (2), 111-121
- 131 - FREEMAN B., BRIDGES B.A., 1960
Suitability of various plating media for counting bacteria after exposure to gamma radiation.
Int. J. App. Rad. Isot., 8, 136-138
- 132 - FRESCURA T., VIVOLI P., 1973
Studies of the foot and mouth disease virus sub-types using antigens inactivated by gamma radiations.
Zbl. Vet. Med. B, 20, 822-825
- 133 - FRIEFELDER D., 1965
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1965, 54, 128-134
- 127 bis - FLEURETTE J., MADIER S., TRANSY M.J., 1975
Activité bactériostatique de différents antibiotiques après irradiation par rayons gamma.
I.A.E.A. ref (186).

- 134 - FRIESEN B.S., IYER P.S., BAPTIST J.E., MEYN R., RODGERS J.M., 1970
Glucose-induced resistance to gamma-rays in Escherichia coli.
Int. J. of Radiat. Biol., 18, 159-172
- 135 - FUJITA H., MIYAKOSHI M., 1973
Effect of γ irradiation on the synthesis of ribosomal RNA and ribosomal subparticules in Escherichia coli.
Rad. Res., 56, 186-200
- 136 - FULD G.J., PROCTOR B.E., GOLDBLITH A., 1957
Some microbiological aspects of radiation sterilization.
Int. J. Appl. Rad. Isot., 2, 35-45
- 137 - GADEN E.L., HENLEY E.J., 1953
Induced resistance to gamma irradiation in Escherichia coli.
J. Bact., 65, 727-732
- 138 - GALATZEANU I., ANTONI F., 1967
Effets des rayons gamma sur la vitamine B6 et l'acide folique, p. 33
I.A.E.A., ref. (178)
- 139 - GERGELY J., MEDGYESI G.A., IGALI A., 1967
Studies of gamma ray irradiated human immunoglobulin G. p. 115
I.A.E.A., ref. (178)
- 140 - GHYS R., VANDERGOTEN R., PAQUETTE J.C., FREDETTE V., PLAUTE C.,
PAVELANIS V., GILKER J.C., 1967
Radiosensibilité comparée de bactéries et virus pathogènes. p. 243-261
I.A.E.A., ref. (178)
- 141 - GIBBONS J.R.P., ALLADINE N.F., 1967
Gamma ray sterilization of homograft aortic valves. p. 181
I.A.E.A., ref. (178)
- 142 - GIBBONS J.R.P., ALLADINE F.A., 1970
Homograft heart-valve replacement : Report on 110 consecutive replacement using gamma-irradiated grafts. p. 95
I.A.E.A., ref. (182)

- 143 - GIBBONS J.R.P., 1973
Surgical aspects. p. 267
I.A.E.A., ref. (184)
- 144 - GINOZA W., 1967
The effects of ionizing radiations on nucleic acids of bacteriophages and bacterial cells.
Annual Review of Microbiol., 21, 325-368
- 145 - GOLDBLITH S.A., PROCTOR B.E., DAVISON S., OBERLE E.H., BATES C.J., KAN B., HAMMERLE O.A., KUSMIERK B., 1955
How processing conditions affect microorganisms radioresistance.
Nucleonic, 13, 42-45
- 146 - GOLDBLITH S.A., PROCTOR B.E., 1956
Radiation preservation of milk and milk products.
I. Background and problems.
J. Dairy Sci., 39, 374-401
- 147 - GOLDBLITH S.A., 1967
General principles of radio-sterilization. p. 3
I.A.E.A., Vienna, ref. (178)
- 148 - GOPAL-AYENGAR A.R., SHENOY M.A., SINGH B.B., 1971
Role of short-lived transients in radiosensitization of bacterial cells by chemicals.
In Biophysical aspects of radiation quality.
I.A.E.A., Vienna.
- 149 - GOPAL N.G.S., RAJAGOPALAN S., SHARMA G., 1974
Feasibility studies on radiation sterilization of some pharmaceutical products. p. 387
I.A.E.A., ref. (186)
- 150 - GOULD G.W., 1970
Potentiation by halogen compounds of the lethal action of γ radiation on spores of Bacillus cereus.
J. Gen. Microb., 64, 289-300
- 151 - GRAINGER T.H., 1947
J. Bact., 53, 165

- 152 - GRAINGER H.S., HUTCHINSON W.P., 1957
Irradiation of Penicillin.
J. Pharm. Pharmacol., 2, 343
- 153 - GRECZ N., SNYDER O.P., WALKER A.A., ANELLIS A., 1965
Effect of temperature of liquid nitrogen on radiation resistance
of spores of Clostridium botulinum.
Appl. Microbiol., 13, 527-536
- 154 - GRUBER J., 1971
Immunogenicity of purified venezuelan equine encephalitis virus inactivated by ionizing radiation.
Inf. and Imm., 3, (4), 574-579
- 155 - GUNTER S.E., KOHN H.I., 1956
The effect of X rays on the survival of bacteria and yeast.
J. Bact., 71, 571
- 156 - HANGAY G., HORTOBAGYI G., MURANYI G., 1967
Sterilization of hydrocortisone eyeointment by γ irradiation
I. Physical and chemical aspects. p. 55
I.A.E.A., ref. (178)
- 157 - HANGAY G., HORTOBAGYI G., REDAY Z., ZARANDY A., 1967
Radiation sterilization of thyroid. p. 91
I.A.E.A., ref.(178)
- 158 - HANNAN R.S., 1955
Scientific and technological problems involved in using ionizing radiations for the preservation of food.
D.S.I.R. Food Investigation special report n° 61, HMSO London.
- 159 - HARASZTI M., CZECH K., HANGAY G., 1967
Sterilization of hydrocortisone eyeointment by γ irradiation
II. Bacteriological aspects. p. 63
I.A.E.A., ref. (178)
- 160 - HARNULV B.G., SNYGG B.G., 1973
Radiation resistance of spores of *Bacillus subtilis* and *B. stearothermophilus* at various water activities.
J. Appl. Bact., 36, 677-682

- 161 - HIGNETTE J., 1970
Les techniques de dosimétries des rayonnements β et γ .
Journée d'Information sur l'utilisation des rayonnements ionisants
dans les procédés industriels.
A.T.E.N., Grenoble, 10-11 décembre 1970.
- 162 - HILL E.C., PHILLIPS G.O., 1959
The inactivation of Bacillus subtilis spores in penicillin by gamma
radiation.
J. Appl. Bact., 22, 8-13
- 163 - HITCHINS A.B., KING W.L., GOULD G.W., 1966
Disulphide bonds and resistance of spores.
J. Appl. Bact., 29, 505
- 164 - HOLLAENDER A., STAPLETON G.E., MARTIN F.L., 1951
X ray sensitivity of E. coli as modified oxygen tension.
Nature (Lond.), 167, 103
- 165 - HOLLAENDER A., STAPLETON G.E., 1953
Fundamental aspects of radiation protection from a microbiological
point of view.
Physiol. Review, 33, 77-84
- 166 - HOLLAND J., ANTONI F., GALATZEANU I., SCHULMAN M., KOZINETTS G., 1967
Effects of gamma irradiation on the tetracyclines. p. 69
I.A.E.A., ref. (178)
- 167 - HORAKOVA V., 1974
Microbiological problems of radiation sterilization control of disposa-
ble medical products.
I.A.E.A., ref. (186) , p. 53
- 168 - HORAKOVA V., BURIANKOVA E., 1974
Presterilization contamination of disposable medical products and the
choice of minimum sterilization dose.
I.A.E.A., ref. (186) , p. 15
- 169 - HORNE T., 1956
Sterilization by radiation.
The Pharm. J., 27-29

- 170 - HORNE T., 1958

Biochemical applications of large radiation sources with special reference to pharmaceutical products.

United Nations Intern. Conf. on peaceful uses of Atomic Energy 15 P/276.

- 171 - HORTOBÁGYI G., HANGAY G., LUKATS B., MURÁNYI G., ZARÁNDY, 1967

Data on the radiosterilization of some basic pharmaceutical materials.
p. 25

I.A.E.A., ref. (178)

- 172 - HOWARD-FLANDERS P., ALPER T., 1957

The sensitivity of microorganisms to irradiation under controlled gaz conditions.

Rad. Res., 7, 518

- 173 - ICRE N.P., BLANCHARD J.C., 1972

Etude de l'évolution après irradiation des propriétés mécaniques et physico-chimiques des matériaux utilisés pour la fabrication des fournitures médico-chirurgicales radiostérilisées.

Bulletin d'information A.T.E.N., 93, 53-67

- 174 - IDZIAK E.S., INCZE K., 1968

Radiation traitement of foods.

I. Radurization of fresh eviscerated poultry.

Appl. Microbiol., 16, 1061-1066

- 175 - IKEDA K., 1966

Successful peripheral nerve homotransplantation by use of high-voltage electron irradiation.

Arch. Jap. Chin., 35, 679-705

- 176 - INNES B.J., GUSTAFSON D.B., MORRIS E.V., THOMSON N.B., 1971

Effect of sterilization methods on endothelium of homograft and heterograft valves.

J. Surg. Res., 11, 111-118

- 177 - International Atomic Energy Agency, 1966
Vienna.

Food irradiation.

Proceeding of a Symposium held in Karlsruhe , 6-10 June 1966

- 178 - International Atomic Energy Agency, Vienna., 1967
Radiosterilization of medical products.
Proceeding of Symposium, Budapest, 5-9 June 1967
- 179 - International Atomic Energy Agency, Vienna., 1968
Elimination of harmful organisms from food and feed by irradiation.
Proceeding of a panel held at Zeist, the Netherlands, 12-16 June 1967
- 180 - International Atomic Energy Agency, Vienna., 1970
Preservation of fish by irradiation.
(Proc. Panel, Vienna, 1969)
- 181 - International Atomic Energy Agency, Vienna., 1970
Radiation sensitivity of toxins and animal poisons.
Proceeding of a panel held in Bangkok, 19-22 May 1969
- 182 - International Atomic Energy Agency, Vienna, 1970
Sterilization and preservation of biological tissues by ionizing radiation.
Report of a Panel held in Budapest, 16-20 June 1969
- 183 - International Atomic Energy Agency, Vienna., 1973
Radiation preservation of food.
- 184 - International Atomic Energy Agency, Vienna., 1973
Manual on radiation sterilization of medical and biological materials.
Technical Reports series, 'n° 149
- 185 - International Atomic Energy Agency, Vienna., 1974
Experiences in radiation sterilization of medical products.
Proceeding of a working group meeting on the revision of the code of practice and held in Risø, Denmark, 5-9 June 1972.
- 186 - International Atomic Energy Agency, 1974
Symposium on ionizing radiation for sterilization of medical products and biological tissues.
Held in Bombay, 9-13 December 1974.
- 187 - JAYKO M.E., GARRISSON W.M., 1958
Nature, 181, 413

- 188 - JEFFERSON S., CRAWFORD C.G., 1967
Development of industrial sterilization of medical products.
I.A.E.A., ref. (178)
- 189 - JORDAN R.T., KEMPE L.L., 1956
Inactivation of some animal viruses with gamma radiation from Cobalt 60.
Soc. Exp. Biol. Med., 91, 212-215
- 190 - KADOTA H., MIYOSHI H., SHIBATA H., 1959
Response of irradiated bacteria to nutritional substances supplemented to the post irradiation culture medium.
Bull. Inst. for Chem. Res. Kyoto, 37, 408-416
- 191 - KAPLAN C., 1960
Antigenicity of gamma-irradiated vaccinia virus.
J. Hyg. Cambridge, 58, 391-398
- 192 - KAPLAN H.S., SMITH K.C., TOMLIN P., 1961
Nature (London), 190, 794
- 193 - KAPLAN H.S., ZAVARINE R., 1962
Biochem. Biophys. Res. Commun, 8, 432-436
- 194 - KAPLAN H.S., MOSES L.E., 1964
Biological complexity and radiosensitivity.
Science N.Y., 145, 21-25
- 195 - KAPLAN H.S., 1966
DNA strand scission and loss of viability after X irradiation of normal and sensitized bacterial cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 55, 1442-1446
- 196 - KAPLAN H.S., 1968
Macromolecular basis of radiation-induced loss of viability in cells and viruses.
Actions chimiques et Biologiques des Radiations, 71-94,
Ed. Masson.

- 197 - KAZANAS N., EMERSON J.A., 1968
Effects of γ irradiation on the microflora of freshwater fish.
III. Spoilage patterns and extension of refrigerated storage life
of yellow perch fillets irradiated to 0,1 and 0,2 Megarads.
Appl. Microbiol., 16, 242-247
- 198 - KEMPE L.L., GRAIKOSKI J.T., GILLIES R.A., 1954
Gamma rays sterilization of canned meet previously inoculated with
anaerobic bacterial spores.
Appl. Microbiol., 2, 330-332
- 198 bis - KENNY M.T., ALBRIGHT K.L., EMERY J.B., BITTLE J.L., 1969
Inactivation of rubella virus by γ radiation
J. Virol., 4, 807-810
- 199 - KIORTIS M., 1970
Production de coagulase par Staphylococcus aureus irradié.
Ann. Inst. Pasteur, 119, 312-319
- 200 - KITAYAMA S., MATSUYAMA A., 1968
Possibility of the repair of double strand scissions in Micrococcus
radiodurans DNA caused by gamma rays.
Bioch. and Biophys. Res., 23, 418-422
- 201 - KITAYAMA S., MATSUYAMA A., 1971
Mechanism for radiation lethality in M. radiodurans.
Int. J. Radiat. Biol., 19, 13-19
- 202 - KLEN R., PACAL J., 1974
Comparison of some properties of tissue grafts sterilized by "cold
shock" and ionizing radiation.
I.A.E.A., ref. (186)
- 203 - KOH W.Y., MOREHOUSE C.T., CHANDLER V.L., 1956
Relative resistances of microorganisms to cathode rays.
I. Nonsporeforming Bacteria.
Appl. Microbiol., 4, 143-146
- 204 - KOH W.Y., MOREHOUSE C.T., CHANDLER V.L., 1956
Incidence and characteristics of beta radiation survivors (Esche-
richia coli):
Appl. Microbiol., 4, 153-155

- 205 - KULKARNI R.D., GOPAL N.G.S., 1974
Studies on safety and clinical efficacy of some radiation sterilized medical products and pharmaceuticals.
I.A.E.A., ref. (186)
- 206 - LATARJET R., EPHRUSSI B., 1949
Courbes de survie de levures haploïdes et diploïdes soumises aux rayons X.
Compt. Rend. Ac. Sci., 229, 306
- 207 - LAWRENCE C.A., BLOCK S.S., 1968
Disinfection, sterilization and preservation.
Edt. Lea et Febiger, Philadelphia.
- 208 - LEA D.E., HAINES R.B., BRETSCHER E., 1941
J. Hyg., Cambridge, 41, 1
- 209 - LEA D.E., 1946
Action of radiations on living cells.
Cambridge Univ. Press.
- 210 - LEWIS N.F., 1971
Studies on a radioresistant coccus isolated from Bombay Duck (harpodon Neherens).
J. Gen. Microbiol., 66, 29-35
- 211 - LEWIS N.F., ALUR M.D., NADKARNI A.R., GAONKAR S.G., 1973
Selective control of spoilage organisms in seafoods by gamma radiation.
In Radiation preservation of food.
I.A.E.A., Vienna, ref. (183)
- 212 - LEY F.J., FREEMAN B.M., HOBBS B.C., 1963
Studies on the use of ionizing-radiation for the elimination of Salmonellae from various foods.
Cité par Thornley M.J.
Microbiological aspects of the use of radiation for the elimination of Salmonellae from foods and feeding stuffs.
Technical reports series, n° 22 I.A.E.A., Vienna.
- 213 - LEY F.J., TALLENTIRE A., 1965
Radiation sterilization : the choice of dose.
Pharm. J., 4, 216

- 214 - LEY F.J., WINSLEY B., HARBORD P., KEALL A., SUMMERS T., 1972
Radiation sterilization : microbiological findings from subprocees
dose treatment of disposable plactics syringes.
J. Appl. Bact., 35, 56-61
- 215 - LEY F.J., 1973
The effect of ionizing radiation on bacteria. p. 37 - 63
I.A.E.A., ref. (184)
- 216 - LICCIARDELLO J.J., 1964
Effect of temperature on radiosensitivity of Salmonella typhimurium.
J. Food Science, 29, 469-474
- 217 - LICCIARDELLO J.J., NICKERSON J.T.R., GOLDBLITH S.A., SHANNON C.A.,
BISHOP W.W., 1969
Developpement of radiation resistance in Salmonella cultures.
Appl. Microb., 18, (4), 24-30
- 218 - LICCIARDELLO J.J., NICKERSON J.T.R., GOLDBLITH S.A., BISHOP W.W.,
SHANNON C.A., 1969
Effect of repeated irradiation on various characteristics of Salmonella.
Appl. Microbiol., 18, (4), 636-640
- 219 - LICCIARDELLO J.J., NICKERSON J.T.R., GOLDBLITH S.A., 1970
Inactivation of Salmonella in poultry with gamma radiation.
Poultry Science, 49, 663-675
- 220 - LITTLE K., 1970
Some effects of sterilizing doses of radiation on biological tissues.
p. 37
I.A.E.A., ref. (182)
- 221 - LOPEZ-MARTINEZ DE ALVA L., CRESPO CORTINA M., 1967
Esterilizacion del plasma normal humano y algunas de sus fracciones
por medio de radiaciones gamma. p. 125
I.A.E.A., ref. (178)
- 222 - LURIA S.E., DELBRUK M., 1943
Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance.
Genetics, 28, 491-511

- 223 - LYNN K.R., 1971
Y irradiation of dilute solutions of chymotrypsin : protein substrates.
Rad. Res., 45, 25-34
- 224 - LYNN K.R., 1971
The effects of Y radiation on dilute solution of trypsin.
Rad. Res., 46, 268-278
- 225 - LYNN K.R., 1973
The effect of Y radiolysis on solutions of papain.
Int. J. Radiat. Biol., 23, 477-485
- 226 - LYNN K.R., RAOULT A.P.D., 1973
The effect of Y irradiation on solution of catalase, apocatalase and haematin.
Int. J. Radiat. Biol., 24, 25-31
- 227 - MAC GRATH R.A., WILLIAMS R.W., 1966
Reconstruction in vivo of irradiated E. coli desoxyribonucleic acid ; the rejoining of broken pieces.
Nature, 212, 534-535
- 228 - MALM J.R., FREDERICK O., BOWMAN J.R., HARRIS P.D., KAISER G.A., KOVAKIK A.T.W., 1969
Results of aortic valve replacement utilizing irradiated valve homografts.
Ann. New-York Acad. Sci., 147, 740-747
- 229 - MARCOVICH H., 1963
Aspects quantitatifs de l'action biologique des radiations ionisantes.
Techniques de Laboratoire, Tome II, J. Loiseleur.
Ed. Masson.
- 230 - MATHIEU L., FLEURETTE J., TRANSY M.J., 1970
Les transplantations dentaires : constitution d'une banque de dents et problèmes de stérilisation.
Ann. Odonto.Stom., XXVII, 13
- 231 - MATSUYAMA A., THORNLEY M.J., INGRAM M., 1964
The effect of freezing on the radiation sensitivity of vegetative bacteria.
J. Appl. Bact., 27, 110-124

- 232 - MATSUYAMA A., THORNLEY M.J., INGRAM M., 1964
The effect of freezing on the radiation sensitivity of bacterial spores.
J. Appl. Bact., 27, 125-133
- 232 bis - MIDURA T.F., KEMPE L.L., GRAIKOSKI J.T., MILONE N.A., 1965
Résistance of *Clostridium perfringens* type A
Appl. Microbiol., 13, 244-47
- 233 - MOOS W.S., 1952
Variation of irradiation effects on microorganisms in relation to physical changes of their environment.
J. Bact., 53, 688-690
- 234 - MORGAN B.H., REED J.M., 1954
Resistance of bacterial spores to gamma irradiation.
Food. Res., 19, 357-366
- 235 - MOSELEY B.E.B., LASER H., 1965
Repair of X damage in M. radiodurans.
Proc. Roy. Soc. (London) Ser B, 162, 210-222
- 236 - MOSELEY B.E.B., MATTINGLY A., COPLAND H.J.R., 1972
Sensitization to radiation by loss of recombination ability in a temperature-sensitive DNA mutant of M. radiodurans held at its restrictive temperature.
J. Gen. Bact., 72, 329-338
- 237 - MOSSEL D.A.A., 1957
The presumptive enumeration of lactose negative as well as lactose positive Enterobacteriaceae in foods.
Appl. Microbiol., 5, 379
- 238 - MULLENGER L., ORMEROD M.G., 1969
The radiosensitization of Micrococcus sodonensis by N ethyl maleimide.
Int. J. Radiat. Biol., 15, (3), 259-269
- 239 - MULLER A., HUTTERMANN J., 1973
Structure and formation of free radicals in irradiated single crystal of nucleic acids constituents.
An. Of N.Y. Acad. Sci., 222, 411-431

240 - MYERS L.S., 1973

Free radical damage of nucleic acids and their components by ionizing radiation.

Federation proceeding, 32, (8), 1882-1894

241 - NEGRETTI F., 1974

Evaluation comparative de l'activité immunisante de vaccins bactériens stérilisés par la chaleur ou par des radiations ionisantes. P. 51-57

International Symposium on Sterilization and Sterility testing of Biological substances.

Ed. Regamey R.H., Gallardo F.P., Hennessen W. ; Karger Basel, Munich

242 - NOFRE C., 1968

La radiolyse de la thymine et ses implications radiophysiologiques.

Thèse de Doctorat es-sciences Naturelles, Université de Lyon.

242 bis - OEDING P., HAUKENES G., 1963

Identification of Staphylococcus aureus antigens and antibodies by means of the gel precipitation technique.

Acta Path. Microbiol. Scand., 57, 458-

243 - OGG A.J., 1967

Gamma ray sterilization in ophtalmology, p. 49

I.A.E.A., ref. (178)

244 - OLIVER R., TOMLINSON A.H., 1960

The sterilization of surgical rubber gloves and plastic tubing by means of ionizing radiation.

J. Hyg. Camb., 58, 465

245 - OSTERBERG B., 1973

Microbiological evaluation of suture items before radiation sterilization.

Appl. Microbiol., 26, 354-358

246 - OSTERBERG B., 1974

Radiation sensitivity of the microbial flora present on suture material prior to irradiation.

Acta Suecica, 11, 53-58

247 - OSTROWSKI K., KOSSOWSKA B., MOSKALEWSKI S., KOMENDER A., KURNATOWSKI W., 1967

Radiosterilization of tissues preserved for clinical purposes : effect on tissue antigenicity. p. 139

I.A.E.A., ref., (178)

- 248 - OSTROWSKI K., MOSKALEWSKI S., 1973
Organization of tissue banks based on the radiosterilization technique. p. 283
I.A.E.A., ref. (184)
- 249 - PANDULA E.L., FARKAS E., RACZ I., 1967
Effects of radiosterilization on sealed aqueous solutions. p. 83
I.A.E.A., ref. (178)
- 250 - PEPPER R.E., BUFFA N.T., CHANDLER V.L., 1956
Relative resistance of microorganisms to cathode rays.
III. Bacterial spores.
Appl. Microb., 4, 149-152
- 251 - PERSINA Z.G., TUMANYAN M.A., 1968
Radiostérilisation de boîtes de Pétri, de seringues et d'autres articles en matière plastique à usage médical.
20th Anniversary All-Union Conference on the production and use of isotopes and nuclear radiation in U.S.S.R.
Minsk, 7-12 October 1968, 6, 37
- 252 - PHILLIPS G.O., 1973
Medecines and pharmaceutical basic materials. p. 207
I.A.E.A., ref. (184)
- 252 bis - PILLET J., ORTA B., CORRIERAS F., 1967
Serotypie des staphylocoques. Intérêt d'une réduction du nombre des souches types utilisées.
Ann. Inst. Pasteur, 113, 363-374
- 252 ter - PILLET J., ORTA B., 1970
Recherche sur l'analyse sérologique des staphylocoques coagulase négatifs. Etude de deux sérotypes.
Ann. Inst. Pasteur, 119, 193-205
- 253 - PLECEAS M., BITTNER J., VOINESCU V., 1969
Effect of gamma-irradiation on spores of some species of the Clostridium genus.
Acta Biol. Med. Germ., 23, 921-923
- 254 - PLECEAS M., ARIZAN D., 1969
Action des radiations ~~gamma~~ sur les bactéries utilisées comme indicateur sanitaire.
Arch. Roum. Path. Exp. Microb., 28, 587-590

- 255 - PLECEAS M., ROMANESCU G.H., ARIZAN D., HLEVCA B., 1970
Effet radioprotecteur de l'éthylène-glycol en présence de certaines substances bactéricides.
Arch. Roum. Path. Exp. Microb., 29, 623-627
- 256 - POLLARD E.C., GOULD W.R., HUTCHINSON F., SETLOW R.B., 1955
The direct action of ionizing radiation on enzymes and antigens.
Prog. Biophys. Biophyschem., 5, 72-78
- 257 - POLLARD E.C., ACHEY P.M., 1964
Radiation action on DNA in bacteria. Effect of oxygen.
Science N. York, 146, 71-73
- 258 - POLLARD E.C., ACHEY P.M., 1966
The action of ionizing radiation on postirradiation synthesis and degradation of DNA in Escherichia coli 15 T⁻ L⁻.
Rad. Res., 27, 419-433
- 259 - POLLARD E.C., 1970
The effect of ionizing radiation on the molecular biology of E. coli.
p. 51-125
In Current Topics in Radiation Research, 6, 1970.
Ed. Ebert M. et Howard A.
- 260 - POLLARD E.C., DAVIS S.A., 1970
The action of ionizing radiation on transcription (and translation) in several strains of Escherichia coli.
Rad. Res., 41, 375-399
- 261 - POLLEY J.R., 1961
Preparation of non infective soluble antigens with gamma radiation.
Can.J. Microb., 7, 135-139
- 262 - POLLEY R.,
Factors influencing inactivation of infectivity and hemagglutinin of influenza virus by gamma irradiation.
Can. J. Microb., 7, 535-541
- 263 - POLVERELLI M., TEOULE R., 1974
Gamma irradiation of cytosine in an aerated aqueous solution.
I. Identification of radiolysis products of cytosine resulting from the deamination pathway.
Z. naturforsch., 29, 12-15
II. Kinetic study of the formation of the radiolysis products of cytosine resulting from the deamination pathway.
Z. naturforsch., 29, 16-18

- 264 - POWELL D.B., BRIDGES B.A., 1960
Processing by irradiation.
I. Sterilization of medical and pharmaceutical products.
Research., 13, 151-156
- 265 - POWELL D.B., 1973
Packaging requirement. p. 111
I.A.E.A., ref. (184)
- 266 - POWELL W.F., POLLARD E., 1955
Rad. Res., 2, 109
- 267 - POWERS E.L., 1965
Some recent advances in the radiation biology of bacteria.
The radiological Clinics of North America, 3, 197-208
- 268 - PREVITTE J.J., CHANG Y., EL BISI H.M., 1970
Effects of radiation pasteurization on Salmonella.
I. Parameter affecting survival and recovery from chicken.
Can. J. Microb., 16, 465-471
- 269 - PREVITTE J.J., CHANG Y., SCRUTCHFIELD W., EL BISI H.M., 1971
Effects of radiation pasteurization on Salmonella.
II. Influence of repeated radiation-growth cycles on virulence and resistance to radiation and antibiotics.
Can. J. Microb., 17, 105-110
- 270 - PREVITTE J.J., CHANG Y., EL BISI H.M., 1971
Effects of radiation pasteurization on Salmonella.
III. Radiation lethality and the frequency of mutation to antibiotic resistance.
Can. J. Microb., 17, 385-389
- 271 - PROCTOR B.E., GOLBLITH S.A., 1951
Electromagnetic radiation fundamentals and their application in food technology.
Advances in Food Res., 3, 120
- 272 - PROCTOR B.E., GOLBLITH S.A., BATES C.J., HAMMERLE O.A., 1952
Biochemical prevention of flavor and chemical changes in foods and tissues sterilized by ionizing radiations.
Food technology, 7, 237

- 273 - PROCTOR B.E., NICKERSON J.T.R., LICCIARDELLO, 1956
Cathode ray irradiation of chicken meat for the extension of shelf life.
Food Research, 21, 11-20
- 274 - PROCTOR B.E., GOLDBLITH S.A., FULD G.J., OBERLE E.M., 1958
Radiosensitivity of Bacillus thermoacidurans spores under different environmental conditions.
Rad. Res., 8, 51
- 275 - RAINEY H.B., 1968
New Zealand experience with a 60 Co sterilization unit.
Isot. and Rad. Tech., 6, 93-99
- 276 - READ R.B., BRADSHAW J.G., 1967
irradiation of Staphylococcal enterotoxin B.
Appl. Microb., 15, 603-605
- 277 - REDPATH J.L., 1973
Radioprotection of enzyme and bacterial systems by dithiothreitol.
Rad. Res., 55, 109-117
- 278 - REITMAN M., 1969
Non viable venezuelan equine encephalomyelitis hemagglutinin prepared from tissue cultures by gamma radiation.
Appl. Microb., 18, 278-279
- 279 - REITMAN M., TONIK E.J., 1971
Immunity to aerosol challenge in Guinea pigs immunized with gamma irradiated venezuelan equine encephalitis vaccines.
Appl. Microb., 21, 688-692
- 280 - RIEDER H., 1898
Munch Med. Wschr, 24, 101
- 281 - ROBERTS T.A., INGRAM M., 1965
Radiation resistance of spores of Clostridium species in aqueous suspensions.
J. Food. Sci., 30, 879-885
- 282 - ROBERTS T.A., 1970
Recovering spores damaged by heat, ionizing radiation and ethylene oxide.
J. Appl. Bact., 33, 74-94.

- 283 - ROSS D., YACOB M., 1969
Remplacement des valves aortiques par homogreffe. Revue critique.
Acquisitions nouvelles en pathologie Cardiovasculaire, 11, 313-332
- 284 - ROWLEY D.B., NEWCOMB H.R., 1964
Radiosensibility of several dihydrogenases and transaminases during sporogenesis of Bacillus subtilis.
J. Bact., 87, 701
- 285 - DE SAINT-AUBERT G., BRUNELET L., SARRAZIN P.L., VIDAL P., 1963
Etude de la résistance aux rayonnements ionisants de germes déterminés inoculés dans un hachis de jambon précuit, conditionné en boîtes métalliques.
An. Nutrition et Alimentation, 17, 405-425
- 286 - DE SAINT-AUBERT G., VALETTE L.R., PLAN R., CHERBY D., 1967
Essais d'exposition aux radiations gamma de petits articles médicaux et de solutions protéiniques pharmaceutiques.
I.A.E.A., ref. (178)
- 287 - SAKAGUCHI G., 1970
Radiosensitivities of Cl. botulinum type E toxins. p. 31-40
I.A.E.A., ref. (181)
- 288 - SCHMIDT C.F., NANK W.F., 1960
Radiation sterilization of food. I. Procedures for the evaluation of the radiation resistance of spores of Cl. botulinum in food products.
Food Res., 25, 321-327
- 289 - SCHMIDT C.F., 1963
Appendix II. Dose requirements for the radiation sterilization of food.
Int. J. Appl. Rad and isotopes, 14, 19-26
- 290 - SCHNELL J., PLENIO H.G.; PAULIN W., BRAUN B., KORB G., 1967
The influence of ionizing radiation on various collagen-containing medical bioproducts. p. 145
I.A.E.A., ref. (178)
- 291 - SCHUSTER A., 1970
citée par Pollard E.C.
The effect of ionizing radiation on the molecular biology of Escherichia coli.
In Current Topics in Radiation Research, 6, 1970
Ebert M., Howard A., Edts.
North Holland Publishing company.

- 292 - SEHATA A.M., 1961
Effect of combined action of ionizing radiation and chemical preservatives on microorganisms.
Rad. Res., 15, 78-85
- 293 - SETLOW R.B., CARRIER W.L., 1964
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 51, 226-231
- 294 - SHENOY V.T., SRINIVASAN V.F., SING B.B., 1968
Radiochemical basis of sensitization of Staphylococcus aureus by vitamine K5.
Proceed. Of Indian Acad. Sc., 58, 232-239
- 295 - SHENOY M.A., MISHRA K.P., SING B.B., GOPAL-AYENGAR A.R., 1974
A study of reactions of N-ethyl maleimide with cellular fractions during radiosensitization of E. coli B/r.
Int. J. Radiat. Biol., 1974, 25, (3), 303-311
- 296 - SHENOY M.A., SINGH B.B., GOPAL-AYENGAR, 1974
Enhancement of radiation lethality of E. coli B/r by procaine hydrochloride.
Nature, 248, 415-416
- 297 - SHERAGA H.A., WIMS L.F., 1952
Arch. Biochem. Biophys., 36, 336
- 298 - SHOLES G., WEISS J., 1959
Oxygen effects and formation of peroxydes in aqueous solution.
In proceeding of the International Congress of Radiation Research.
Rad. Res., Sup 1, 177-189
- 299 - SILVERMAN G.J., SINSKEY T.J.
The destruction of microorganisms by ionizing radiation, p. 741-760
in Disinfection, sterilization and preservation. Lawrence C.A.- Block S.S.
Ed. Lea et Febiger, Philadelphia, 1968
- 300 - SINGH B.B., SHENOY M.A., GOPAL-AYENGAR A.R., 1971
Iodination of Micrococcus radiodurans and inactivation of the repair systeme.
Ind. Journ. of Exp. Biol., 2, 518-519

- 301 - SKALKA M., ANTONI F., 1970
Effect of radiation on the biological properties of proteins, p. 1-11
I.A.E.A., ref. (181)
- 302 - SKULBERG A., 1970
Toxins produced by Clostridium botulinum and their radiosensitivity.
p. 19
I.A.E.A., ref. (181)
- 303 - SOMMER N., 1973
The effect of ionizing radiation on fungi. p. 73 - 80
I.A.E.A., ref. (184)
- 304 - SPOERL E., LOVELESS L.E., WEISMAN T.H., BALSKE R.I., 1954
Studies on cell division.
II. X radiation as a division inhibiting agent.
J. Bact., 67, 394
- 305 - STAPLETON G.E., EDINGTON C.W., 1953
Temperature dependance of bacterial inactivation by X rays.
J. Rad. Res., 1, 229-230
- 306 - STAPLETON G.E., 1955
Factors modifying sensitivity of bacteria to ionizing radiation.
Bact. Reviews, 5, 26-31
- 307 - STAPLETON G.E., SBARRA A.J., HOLLAENDER A., 1955
Some nutritional aspects of bacterial recovery from ionizing radiations.
J. Bact., 70, 7-14
- 308 - STAPLETON G.E., EDINGTON C.W., 1956
Temperature dependance of bacterial inactivation by X rays.
Rad. Res., 5,(1), 39-45
- 309 - STUMBO , 1963
cité par Thornley M.J.
Microbiological aspects of the use of radiation for the elimination of
Salmonellae from foods and feeding stuffs.
Technical reports serie n° 22, I.A.E.A. Vienne, 81-106

- 310 - STUY J.H., 1960
Studies on the radiation inactivation of microorganisms.
VII. Nature of the X ray induced breakdown of desoxyrinonucleic acid
in Haemophilus influenzae.
Rad. Res., 14, 56-65
- 311 - SUHADI F., KITAYAMA S., OKAZAWA S., MATSUYAMA A., 1972
Isolation and some radiobiological properties of mutants of Micrococcus
radiodurans sensitive to ionizing radiation.
Rad. Res., 49, (1), 197-212
- 312 - SULLIVAN R., FASSOLITIS A.C., LARKIN E.P., READ R.B., PEELER J.T., 1971
Inactivation of thirty viruses by gamma radiation.
Appl. Microb., 22, 61-65
- 313 - SULLIVAN R., SCARPINO P.V., FASSOLITIS A.C., LARKIN E.P., PELLER J.T.,
1973
Gamma radiation inactivation of Coxsackievirus B2.
Appl. Microb., 26, (1), 14-17
- 314 - SYKES G., 1967
Radiation sterilization. p. 146-187
in Desinfection and sterilization, 2nd
Edts Spon L.T.D.
- 315 - SZYBALSKI W. OPARA-KUBINSKA Z., 1961
Rad. Res., 14, 508
- 316 - TALLENTIRE A., POWERS E.L., 1963
Modification of sensitivity to X irradiation by water of Bacillus
megaterium.
Rad. Res., 20, 270
- 317 - TALLENTIRE A., DWYER J., LEY F.J., 1971
Microbiological quality control of sterilized products : Evaluation
of a model relating frequency of contaminated items with increasing
radiation treatment.
J. Appl. Bact., 34, 521-534
- 318 - TALLENTIRE A., 1970
Radiation resistance of spores.
J. Appl. Bact., 33, 141-146

- 319 - TALLENTIRE A., KHAN A.A., 1974

Tests of the validity of a model relating frequency of contaminated items and increasing radiation dose.

I.A.E.A., ref. (186)

- 320 - TANOOKA H., 1968

Resistance of transforming activity of DNA in bacterial spores to ionizing and ultraviolet radiations.

In abstracts of the International Symposium on genetic effects radiation and radiomimetic chemicals. Kyoto, Japon.

- 321 - TANOOKA H., SAKAKIBARA Y., 1968

Radioresistant nature of the transforming activity DNA in bacterial spores.

Biochim. Biophys., 155, 130

- 322 - TANNOKA H., TERANO H., 1970

Resistance of DNA against radiation-induced strand breakage in bacterial spores.

Rad. Res., 43, 613-626

- 323 - TATTERSALL K., 1965

Problems of microbicidal contamination in prepackaged preparations, ionizing radiation for the sterilization of medical products; panel on gamma and electron irradiation.

London, 15

- 324 - TERANO H., TANOOKA H., KADOTA H., 1969

Germination-induced repair of single-strand breaks of DNA in irradiated Bacillus spores.

Biochem, Biophys. Res. Commun., 37, 66-71

- 325 - TERANO H., TANOOKA H., KADOTA H., 1971

Repair of radiation damage to deoxyribonucleic acid in germinating spores of Bacillus subtilis.

J. Bact., 106, 925-930

- 326 - THIEULIN G., BRUNELET L., SARRAZIN P., BASILE D., 1959

Effet des rayonnements ionisants sur la flore microbienne de l'oeuf cassé congelé.

Bull. Acad. Vétérinaire de France, 10, 589-602

- 327 - THORNLEY M.J., INGRAM M., BARNES E.M., 1960
The effects of antibiotics and irradiation on the *Pseudomonas* - *Achromobacter* flora of chilled poultry.
J. Appl. Bact., 23, 487-498
- 328 - THORNLEY M.J., 1962
The relative resistance to ionizing radiation of strains of *Pseudomonas* and *Achromobacter*.
J. Appl. Bact., 25,
- 329 - THORNLEY M.J., 1963
Microbiological aspects of the use of radiation for the elimination of *Salmonellae* from foods and feeding stuffs.
Technical reports series, n° 22,
I.A.E.A., Vienna, p. 81-106
- 330 - THORNLEY M.J., HORNE R.W., GLAUERT A.M., 1965
The fine structure of *Micrococcus radiodurans*.
Arch. Mikrob., 51, 267-289
- 331 - TRANSY M.J., 1972
Rapport de stage de virologie effectué au laboratoire du Prof. Sohier dans le cadre du Certificat de Biologie Humaine de Bactériologie et Virologie systématiques.
- 332 - TRANSY M.J., 1973
Comparaison du pouvoir immunogène de deux souches de *Staphylococcus aureus* inactivées par le formol et les rayons ionisants.
Rapport de stage effectué dans le cadre du Certificat de Biologie Humaine d'Immunologie Générale.
- 333 - TRANSY M.J., MIKAELOFF P., FLEURETTE J., 1974
La stérilisation des valvules cardiaques humaines par rayonnement gamma. Réduction de la dose stérilisante, Résultats cliniques.
Lyon Médical, 232, 9-15
- 334 - TRIANTAFYLLOU N.M., 1973
Observation on the clinical use of freeze dried irradiated allografts in bone transplantation. p. 273
I.A.E.A., ref. (184)

- 335 - TRIANTAFYLLOU N., KARATZAS P., 1974

The effects of the sterilizing doses of the ionizing radiation of the mechanical properties of various connective tissue allo-grafts.

I.A.E.A., ref. (186)

- 336 - TROITSKY V.L., TUMANYAN M.A., PERSHIHA Z.G., VADIMOV B.M., KRUSHCHEV V.G., KAULEN D.R., GONEHARENKO I.M., CHAKHAVA O.V., DUPLISHCHEVA A.D., SEDOVA T.S. 1958

Principles of using ionizing radiation in the production of bacterial preparation.

Proc. Second Internat Conf. peaceful uses atomic energy, 26, 348

- 337 - TUMANYAN M.A., 1967

Use of ionizing radiations to prepare radiovaccins and radioantigens. p. 231-241

I.A.E.A., ref. (178)

- 338 - TUMANYAN M.A., 1968

Action des rayonnements ionisants sur les microorganismes et radiostérilisation de produits médicaux.

20th Anniversary All-Union conference on the production and use of isotopes and nuclear radiation in the U.S.S.R.

Minsk, 7-12 Octobre 1968, 6, 33

- 339 - TUMANYAN M.A., 1973

Radiosterilization of prepared vaccines. p. 291

I.A.E.A., ref., (184)

- 340 - UNDERDAL B., ROSSEBO L., 1972

Inactivation of strains of Salmonella senftenberg by gamma irradiation.

J. Appl. Bact., 35, 371-377

- 341 - UPADHYAY J., GRECZ, 1969

Radiation survival of bacterial spores in neutral and alkaline ice.

Can. J. Microb., 15, 1419-1425

- 342 - VAN HEMMEN J.J., MEULING W.J.A., DE JONG J., LEITHJENS L.H., 1974

Radioprotection of biologically-active DNA by cysteamine : a rapid-mix study.

Int. J. Radiat. Biol., 25 (5), 455-464

- 343 - VAN WINKLE, BORIK P.M., FOGARTY M., 1967
Destruction of radiation-resistant microorganisms on surgical sutures by Cobalt-60 irradiation under manufacturing condition.
I.A.E.A., ref. (178)
- 344 - VINTER V., 1959
Differences in cysteine content between vegetative cells and spores Bacillus cereus and Bacillus megaterium.
Nature (London), 183, 998
- 345 - WAGENAAR R.O., DACK G.M., 1959
Studies on purified type A Clostridium botulinum toxin subjected to ultracentrifugation and irradiation.
Food Res., 24, 57-61
- 346 - WAGENAAR R.O., DACK G.M., 1960
Studies on the inactivation of type A Clostridium botulinum toxin by irradiation with Cobalt 60.
Food. Res., 25, 279-284
- 347 - WALLACE R.B., GUILIANI E.R., TITUS J.L., 1971
Use of aortic valve homografts for aortic valve replacement.
Circulation, XLIII, 365-373
- 348 - WEBB R.B., POWERS E.L., 1961
Water, glycerol and oxygen as factors in radiation sensitivity of bacterial spores.
Rad. Res., 1961, 14, 515-516
- 349 - WEISS J., 1944
Nature, London, 153, 748
- 350 - WHEATON E., PRATT G.B., 1962
Radiation survival curves of Clostridium botulinum spores.
J. Food Sci., 27, (4), 327-334
- 351 - WITKIN E., 1946
Inherited differences in sensitivity to irradiation in E. coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 32, 59

- 352 - WITKIN E., 1947
Genetics of resistance to radiation in E. coli,
Genetics, 32, 221-248
- 353 - WOESE C., 1959
Further studies on the ionizing radiation inactivation of bacterial
spores.
J. Bact., 77, 38-42
- 354 - WOOD T.H., 1953
Reproducibility of X-ray survival curves for yeast cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 84, 446-452
- 355 - WRIGHT K.A., TRUMP J.G., 1970
Cooperative studies in the use of ionizing radiation for sterilization
and preservation of biological tissues : twenty years' experience.
p. 107
I.A.E.A., ref. (182)
- 356 - WYCKOFF R.W.G., 1930
J. Exp. Med, 52, 435
- 357 - YAMAZAKI K., 1971
Studies on the resistance of Bacillus spores.
Part I. Comparative studies on the radioresistance and chemical composition of Bacillus species.
Agr. Biol. Chemistry, 35, 1449-1458
- 358 - YOUNG W.P., KRONCKE G.M., DACUMOS G.C., ROWE G.C., 1971
A follow-up study of aortic valve homografts for two to four and one
half years.
An. of Thor. Surg., 12, 154-160

T A B L E D E S M A T I E R E S

BIBLIOGRAPHIE

pages

I - <u>GENERALITES SUR LES RADIATIONS IONISANTES</u>	1
I.1. Définition	1
I.2. Propriétés physiques et mécanismes d'interaction avec la matière des différentes radiations	1
I.3. Mécanismes généraux de production de l'ionisation	7
I.4. Sources de rayonnement	8
I.5. Unités de doses	11
I.6. Dosimétrie	12
II - <u>MECANISMES D'ACTION DES RADIATIONS IONISANTES SUR LES CELLULES VIVANTES</u>	15
II.1. Modifications chimiques. Action directe et indirecte	15
II.2. Lésions macromoléculaires et sites cellulaires sen- sibles	20
II.2.1. Altération des protéines	21
II.2.2. Action sur les acides nucléiques	25
II.2.3. Principal site cellulaire sensible	31
III - <u>EFFETS DES RADIATIONS SUR LES MICROORGANISMES</u>	32
III.1. Effet léthal	32
III.2. Effets des rayonnements ionisants sur la physiologie et la structure des microorganismes	37
III.2.1. Respiration	37
III.2.2. Mobilité	37
III.2.3. Effets sur la structure antigénique	37
III.2.4. Effets sur les substances secrétées par les bactéries	41

	pages
III.3. Effets mutagènes des radiations ionisantes	43
III.3.1. Effets sur la radiorésistance	44
III.3.2. Effets sur les caractères morphologiques, culturels et biochimiques	46
III.3.3. Effets sur la virulence	47
III.3.4. Effets sur la résistance aux antibiotiques	47
 IV - <u>FACTEURS MODIFIANT LA RADIOSENSIBILITE</u>	50
IV.1. Facteurs intervenant avant irradiation	50
IV.1.1. Age de la culture	50
IV.1.2. Nombre d'organismes	52
IV.1.3. Milieu de culture	52
IV.2. Facteurs intervenant pendant l'irradiation	52
IV.2.1. Type de radiations	52
IV.2.2. Débit de dose	53
IV.2.3. Teneur en oxygène	53
IV.2.4. Degré d'hydratation	56
IV.2.5. Influence de la température	57
IV.2.6. Influence du pH	59
IV.2.7. Influence du milieu d'irradiation	60
IV.3. Conditions de cultures après irradiation	65
IV.3.1. Milieux de cultures	65
IV.3.2. Effets de la température d'incubation	68
 V - <u>RADIOSENSIBILITES COMPAREES DES MICROORGANISMES</u>	69
V.1. Bactéries	69
V.1.1. Cocci Gram +	69
V.1.1.1. Staphylococcus	69
V.1.1.2. Microcoques	74
V.1.1.3. Streptococcus	79

	pages
V.1.2. Bacilles Gram négatif	89
V.1.2.1. E. coli	89
V.1.2.2. Klebsiella - Enterobacter - Serratia	98
V.1.2.3. Proteus	98
V.1.2.4. Shigella	98
V.1.2.5. Salmonella	107
V.1.2.6. Radiosensibilité des Pseudomonas	120
V.1.2.7. Achromobacter alcaligenes	123
V.1.2.8. Acinetobacter	123
 V.1.3. Bacilles Gram positif non sporulés	 127
V.1.4. Bacilles Gram positif sporulés	130
V.1.4.1. Bacillus	130
V.1.4.2. Bacilles Gram positif sporulés anaérobies	150
 V.1.5. Mycobactéries	 163
 V.2. Levures et champignons	 163
V.2.1. Levures	163
V.2.2. Champignons	166
 V.3. Radiosensibilité des virus	 175
V.4. Vue d'ensemble de la radiosensibilité des microorganismes	186
V.5. Mécanismes responsables des différences de radiosensibilité chez les microorganismes	187
 VI - <u>APPLICATIONS DE LA STERILISATION PAR LES RAYONNEMENTS IONISANTS</u>	 196
VI.1. Détermination des doses stérilisantes	197
VI.2. Radiostérilisation et radiopasteurisation des denrées alimentaires	199
VI.2.1. Stérilisation des aliments	199
VI.2.2. Radiopasteurisation des aliments	201

	pages
VI.3. Radiostérilisation de matériel médico-chirurgical à usage unique	203
VI.3.1. Tenue sous rayonnement des matériaux et différents types de matériel à usage unique radiostérilisés	205
VI.3.2. Doses stérilisantes minima	208
VI.3.3. Contamination du matériel médico-chirurgical avant irradiation	212
VI.3.4. Contrôles microbiologiques après irradiation	217
VI.3.5. "Code of practice"	223
VI.3.6. Différentes législations nationales	225
VI.4. Radiostérilisation des produits pharmaceutiques	226
VI.4.1. Antibiotiques	226
VI.4.2. Vitamines	228
VI.4.3. Hormones stéroïdiennes	229
VI.4.4. Hormones protéiques	231
VI.4.5. Alcaloïdes	231
VI.4.6. Anesthésiques locaux	232
VI.4.7. Excipients	232
VI.4.8. Substances diverses	233
VI.4.9. Plasma, protéines sanguines et anatoxines	233
VI.5. Radiostérilisation de tissus biologiques	235
VI.5.1. Valves cardiaques	235
VI.5.2. Radiostérilisation de tissus osseux	240
VI.5.3. Radiostérilisation de nerfs	243
VI.5.4. Radiostérilisation de parois vasculaires	245
VI.5.5. Radiostérilisation de dents	246
VI.5.6. Radiostérilisation de tissus divers	246
VI.6. Préparation de vaccins par irradiation	248

A - MATERIEL ET METHODES

I - <u>SOUCHES TESTEES</u>	255
I.1. Origine des différentes souches	256
I.2. Caractères des différentes souches	256
II - <u>DETERMINATION DE LA RADIOSENSIBILITE</u>	284
II.1. Préparation des échantillons microbiens	284
II.2. Irradiations	287
II.3. Numérations	290
II.4. Lecture des résultats	293
III - <u>COURBES D'INACTIVATION ET DETERMINATION DE LA D10</u>	294

B - RESULTATS

I - <u>EXPERIENCES PRELIMINAIRES POUR LE CHOIX DU MILIEU DE CULTURE ET DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION APRES IRRADIATION</u>	296
I.1. Etude avec la souche de <u>S. aureus</u> 71/02/24	296
I.2. E. coli	299
I.3. Conclusions et discussions	301
II - <u>RADIOSENSIBILITE DES SOUCHES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS</u>	305
II.1. Radiosensibilité en milieu liquide	305
II.2. Radiosensibilité à l'état sec	314
II.3. Discussion des résultats	314
III - <u>RADIOSENSIBILITE DE STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS</u>	316
III.1. Radiosensibilité en milieu liquide	316
III.2. Radiosensibilité à l'état sec	324
III.3. Discussion des résultats	324

	pages
IV - <u>RADIOSENSIBILITE DES STREPTOCOQUES</u>	327
IV.1. Streptococcus faecalis	327
IV.2. Streptococcus durans	327
IV.3. Streptococcus faecium	331
IV.4. Discussion des résultats	336
V - <u>RADIOSENSIBILITE DES ESCHERICHIA COLI</u>	339
V.1. Escherichia coli non entéropathogènes	339
V.2. Escherichia coli entéropathogènes	339
V.3. Discussion et conclusion	345
VI - <u>RADIOSENSIBILITE DES PSEUDOMONAS AERUGINOSA</u>	347
VI.1. Souche 414 Lausanne	347
VI.2. Souches sauvages	347
VI.3. Discussion des résultats	351
VII - <u>RADIOSENSIBILITE DES ACINETOBACTER</u>	352
VII.1. Résultats	352
VII.2. Discussion des résultats	355
VIII - <u>RADIOSENSIBILITE DES LEVURES DU GENRE CANDIDA</u>	357
VIII.1. Résultats	357
VIII.2. Discussion des résultats	357
IX - <u>RADIOSENSIBILITE DES SPORES DE BACILLUS PUMILUS</u>	362
IX.1. Radiosensibilité des spores en suspension	362
IX.2. Radiosensibilité des spores irradiées à l'état sec	362
CONCLUSIONS	369

